生命科学名著

〔美〕 M.T. 马迪根
J.M. 马丁克 等 编著

李明春 杨文博 主译

科学出版社 生命科学分社
编辑推荐
Editor's Choice

（下 册）

（原书第11版）

BROCK微生物生物学

BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS

(11th Edition)

内含光盘

科学出版社
www.sciencep.com

(Q-2037.0101)



左侧的插图是一张在澳大利亚西部某碱湖发现的碳酸钙生物膜（绿色）及其中生长的蓝细菌（黄色）的激光共聚焦扫描显微镜图。蓝细菌是光养原核生物，大都生存在强碱性和高盐度的碱湖水域中。它们是光能自养菌，正如绿色植物那样，它们能够进行光合作用并生产氧气。但是，蓝细菌比绿色植物在地球上早出现了几十亿年。这些微小的生物通过光合作用产生了高等生命进化所需的氧。从更加个人的观点来讲，如果没有蓝细菌的出现，你现在不可能读到这些文字，地球生物永远只能停留在细菌阶段。

蓝细菌只是你在第11版的Brock微生物生物学中将要了解的众多微生物类群之一。像以往一样，这本书是按照进化和多样性的原则串联成册的。以此为基础，结合最新的汇总资料，这本书揭示了当今微生物学的各个方面：普通微生物学和细胞生物学、分子生物学和遗传学、生物多样性和基因组学、代谢多样性和微生物生态学、免疫和宿主应答、微生物引起的疾病以及生物技术和工业微生物学。除了这些，你还会发现第11版Brock微生物生物学内容详尽，结构紧密，并且语言生动。因此，无论是学生还是教师都会从这本有趣的图书中受益匪浅。

欢迎来到21世纪的微生物学领域！你将喜欢上你所看到的东西！

全书内容

ISBN 978-7-03-021262-7

9 787030 212627 >

生物分社
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:lifescience@mail.sciencep.com

定价：248.00 元（上下册，含光盘）

销售分类建议：生命科学／微生物学

Brock 微生物生物学

（原书第 11 版）

（下　册）

BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS
(11th Edition)

〔美〕M. T. 马迪根　J. M. 马丁克 等　编著
李明春　杨文博　主译

科 学 出 版 社
北　京

图字：01-2006-7053 号

内 容 简 介

Brock Biology of Microorganisms 是美国优秀的微生物学教材。该书自 1970 年第 1 版到 2006 年的第 11 版，已有 36 年的历史。它以新颖、先进、严谨的内容，丰富精美的图片，启发式的知识结构和巧妙的构思，赢得了广大师生的青睐。

本书的内容博大精深，从微生物学基础，进化微生物学和微生物多样性，代谢多样性和微生物生态学，免疫学、致病性和宿主反应，微生物疾病，工业微生物学等六部分入手，详尽地介绍了微生物的结构、营养、代谢、遗传、生长和调控，主要的微生物疾病，微生物多样性，微生物生态，微生物进化等内容。

本书具有全面性、系统性和广泛性的特点，知识丰富、阐述清晰、简明易懂、条理性强、可读性强。可作为综合性大学、医学院校、农林院校、轻工业院校等生命科学、医学、药学等专业师生及相关研究人员的微生物学教材或参考书。

图书在版编目(CIP)数据

Brock 微生物生物学（原书第 11 版）（上下册）/（美）马迪根（M. T. Madigan）等编著；李明春，杨文博主译. —北京：科学出版社，2009
（生命科学名著）
ISBN 978-7-03-021262-7

Ⅰ.B… Ⅱ.①马…②李…③杨… Ⅲ.微生物学-高等学校-教材 Ⅳ.Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 029180 号

责任编辑：李 晓 王 静 席 慧/责任校对：陈玉凤
责任印制：钱玉芬/封面设计：陈 敬

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

源海印刷有限责任公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*

2009 年 1 月第 一 版 开本：787 × 1092 1/16
2009 年 1 月第一次印刷 印张：97
印数：1—2 500 字数：2 181 000

定价：248.00 元
（上下册，含光盘）
（如有印装质量问题，我社负责调换<环伟>）

南开大学教材资助立项项目

译者名单

（按姓氏笔画排序）

马　挺　牛淑敏　白　钢　乔文涛　刘　方
严　冰　李国强　李明春　肖　亮　宋存江
杨文博　陈月华　张心平　张　峻　徐海津
蔡　峻　潘　皎　魏东盛



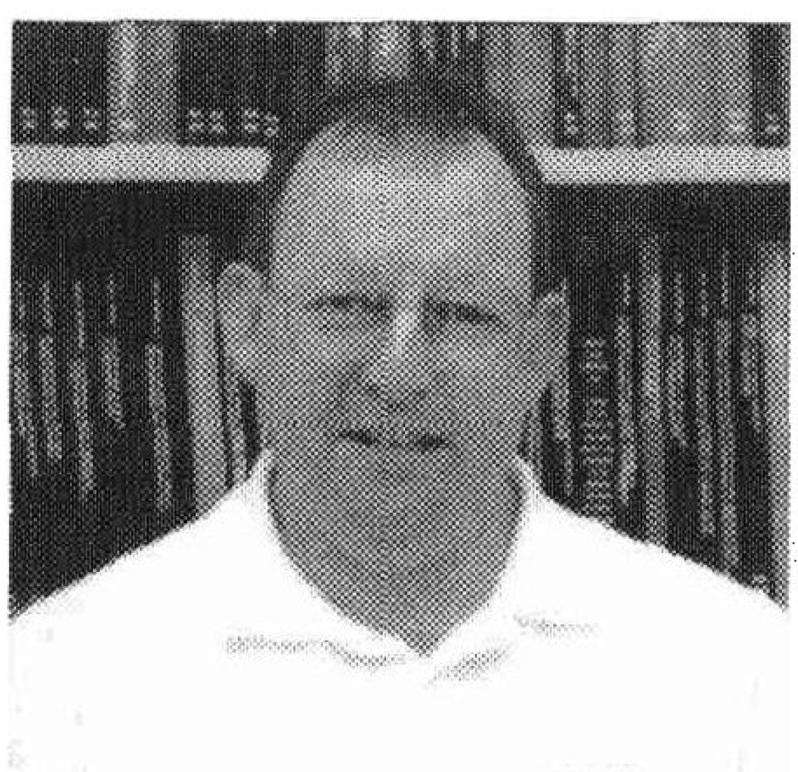
M. T. 马迪根　他把这本著作献给如图所示的两位老朋友——两只爱犬：威莉（Willie）和普拉姆(Plum)。他说："在过去的11年里，这两只可爱的动物给了我只有爱狗的人才能体会到的舒适和友谊。威莉总是可爱小狗的模范；相反，普拉姆（于2004年4月16日去世）被丢弃了。不过说实话，她曾经也有一颗善良的心，也爱人们。她静静地躺在那里看着我，我们从不经过那个地方，让她安息吧！"

J. M. 马丁克　他把这本书献给他以前和现在的学生。他说："那些最好的学生总是连续不断地从新的观点中提出问题，这不仅鼓励我教他们，而且增加了我的知识，同时提高了我的理解能力。我把这本书献给所有那些我曾荣幸教过的人，同时也感谢他们教给了我不少东西！"

作 者 简 介



M. T. 马迪根于1971年在Stevens Point的威斯康星州立大学（Wisconsin State University）获得生物学和教育学学士学位，并于1974年和1976年分别在威斯康星大学（University of Wisconsin，Madison）细菌学系获得硕士学位和博士学位。在Thomas D. Brock教授的指导下，他完成了有关温泉中光合细菌的生物学研究毕业论文。在随后的三年博士后研究中，他与Howard Gest在印第安纳大学（Indiana University）微生物系一起进行有关光合细菌的研究，之后受聘于Cabondale的南伊利诺斯大学（Southern Illinois University，SIU），任微生物学教授。从第4版（1984）开始，他就一直是《微生物生物学》的著者之一，同时他还讲授微生物学导论、细菌多样性以及诊断和应用微生物学的课程。1988年和1993年分别当选为科学学院杰出教师和杰出研究者，2001年获得美国大学杰出奖，2003年获得了由美国微生物学会颁发的用于奖励卓越本科教学的Carski奖。他主要从事厌氧光合营养细菌的研究，尤其是那些能生活在极端环境的种类。他发表了100篇研究论文，并合著了一篇关于光合细菌的专题论文，同时也是《微生物年鉴》杂志（*Archives of Microbiology*）的编辑和主编。除了生命科学研究外，他的爱好还有读书、徒步旅行、植树、照顾狗和马。他和妻子南希、两条狗（Willie和Pupagano）、两匹马（Springer和Feivel）住在距离南伊利诺斯大学约五英里远的一个宁静的湖边。



J. M. 马丁克在克利夫兰州立大学（Cleveland State University）获得生物学理学学士学位。在大学期间，他在几个微生物学和免疫学实验室参与合作研究项目并获得研究经验。毕业后在卡西西储大学（Case Western Reserve University）作为实验室负责人工作了两年，他从事化脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）结构血清学和流行病学的研究。随后他去了布法罗的纽约州立大学（State University of New York）进行深造，从事抗体特异性和抗体独特型的研究，获得了微生学硕士和博士学位。博士后期间，在纽约的阿尔伯特爱因斯坦医学院（Albert Einstein College of Medicine）从事组织相容性复合蛋白的结构研究。从1981年起，他在Carbondale的南伊利诺斯大学（Southern Illinois University）微生物系工作，任主任和副教授。他的研究兴趣包括生长激素在免疫反应中的作用，大豆褐色根茎疾病的免疫诊断和结构突变引起的多肽组织相容性复合蛋白功能的变化。他为大学本科和研究生讲授免疫学课程，同时也负责教授普通微生物学课程中的免疫学、宿主防御和感染性疾病部分。2004年，被评选为科学学院的杰出教师。他还是一名热心的高尔夫球手和自行车骑手。他和妻子朱迪——一所高等专科学校的教师住在Carbondale。

译　者　序

《Brock 微生物生物学》（*Brock Biology of Microorganisms*）是美国优秀的微生物学教材之一，已被 Stanford University、Northwestern University、University of Chicago、Louisiana State University 等几百所世界著名大学作为本科生教材使用。

本书先后由美国 University of Wisconsin 的 Thomas D. Brock 教授、Southern Illinois University Carbondale 的 Michael T. Madigan 教授、John M. Martinko 教授和 Jack Parker 教授编著。自 1970 年出版第 1 版以来，已有 36 年的历史，平均每三年左右修订并推出一个新版，其频率之快，在高等教材中是少见的。这也从另一个角度说明本书适应微生物学领域迅猛发展的需要，能充分反映微生物学科发展的前沿问题、新的技术和成果，以此满足广大师生对新知识的渴求。*Brock Biology of Microorganisms* 以极其丰富、准确、前沿的内容，简洁明快的表格、色彩鲜艳的模式图和照片*，赢得了教师和学生的青睐。因此，Thomas D. Brock 也成了近 50 年来最杰出的科学家和教育家之一。

1980 年四川大学、南开大学、复旦大学、武汉大学、山东大学和云南大学六所院校联合翻译出版了该书第 2 版的中译本（人民教育出版社出版）；2001 年，南开大学翻译的第 8 版，由科学出版社出版发行，作为我国高校微生物教学的参考书，颇受读者欢迎。2006 年，第 11 版的问世，使我们再一次萌动了将其翻译成中文版的欲望，急切地想将这一最新教材介绍给我国更多的读者。因为该版不仅增加了更多更新的内容，而且其编排也较前几版更加合理，在将概念进行重新整合的同时，加入了更丰富多彩的图示进行阐述，所有的表格均被重新设计，使其内容更加容易理解，各章节的内容围绕着逻辑性和实用性进行了更新编排。总之，第 11 版更加便于师生的学习、理解和掌握。

第 11 版的知识内容仍然保持着博大精深的特点，不仅详细地介绍了微生物的结构与功能、营养、代谢、合成、分子遗传、生长和调控等方面的基础知识；同时还涉及微生物进化系统、微生物物种多样性、微生物代谢多样性、微生物生态、微生物有关的免疫学、致病性、宿主反应及与微生物疾病相关的内容；另外还阐述了微生物在遗传工程、生物技术、工业微生物等方面的应用。该书系统而翔实地体现了现代微生物学发展的水平。作者撷取了大量最新研究成果的资料，以流畅的文笔勾画出了分子微生物学的全貌。全面系统地阐述微生物生物学特性的书籍并不多见，正像它的书名一样，该书展示的是微生物的生物学。第 11 版附有最新的《伯杰氏系统细菌学手册》（2005 年）**，这对于我们从事教学及相关微生物学工作的科学研究人员是非常有用的。

本书是南开大学微生物学系长期从事科研教学第一线工作的老师共同努力的结果。参加本书翻译的主要人员有：马挺、牛淑敏、白钢、宋存江、乔文涛、刘方、肖亮、李

---

* 原书所有彩色图片均在随书所附的光盘中。——出版者

** 附录 B《伯杰氏系统细菌手册》在随书所附的光盘中。——出版者

明春、李国强、严冰、杨文博、陈月华、张心平、张峻（天津市农业科学院）、徐海津、蔡峻、潘皎、魏东盛。本书由杨文博教授统稿。另外，刘娜、胡丹、金映虹、刘莉、滑东辉同学也参加了部分初期翻译工作。在该书的翻译、校对、出版过程中，得到了邢来君教授的大力支持，同时也得到了科学出版社生物分社的热情帮助和支持，在此表示衷心地感谢！

由于本书篇幅大、参加翻译和校对工作的人员多，尽管我们力争前后用词一致、文笔统一，但仍然难免在译法、风格及少数术语等方面存在不足。限于时间、专业知识和翻译水平等原因，不妥之处在所难免，敬请专家、同行和读者予以指正，我们万分感谢！

李明春　杨文博
南开大学生命科学学院
2007 年 11 月于天津

前　　言

我们处在微生物学的时代。在这一门令人振奋的科学中，几乎每天都有新的进展传来：新出现的传染病、新的生物体，以及为我们的探索过程提供便捷的新型工具。这就是当今微生物学发展的步伐。在这里，第 11 版的《Brock 微生物生物学》（*Brock Biology of Microorganisms*，BBOM）为您介绍了当今微生物学的最新发展动态。

这本教材可以追溯到 35 年前，由 Thomas D. Brock 著第 1 版《微生物生物学》（Prentice Hall 于 1970 年出版）起。该书只有一个目的：在现代科学框架中展示微生物学法则。第 11 版的 BBOM 延承了前十个版本的准确性和权威性。

现在的学生以及教师对于微生物学表现出前所未有的需求。信息是大量的，用于支撑学科的背景知识是具有重要意义的，而介绍微生物学的课程不能满足这样的要求。第 11 版 BBOM 的作者敏锐地意识到了这个问题，努力地编写了一本微生物学的教科书，侧重于实验法则的建立以及发表的地点、细节的完善以及对支撑观点进行的整合。我们希望您能认同。

第 11 版中的新内容是什么呢?

曾经受益于以往版本的 BBOM 读者会在新版本中看到一些以前见过的内容。然而，教师们将会发现第 11 版的 BBOM 更适于教学，学生也将会发现与以前的版本相比，它是一个更加宝贵的学习资源。

为了满足现在通过视图进行学习的学生的需求，第 11 版的 BBOM 在教学方法上进行了一些调整。第 11 版的 BBOM 的设计是基于第 10 版所没有的内容之上，加入了更多的图示进行阐述。该书从第 1 版就围绕章节的合理性和实用性进行编排和组织。但第 11 版，我们将每个章节编排成几个具有相关内容的部分，将概念进行整合，使其更容易理解和消化。与以往一样，在每个章节的开始有一个词汇表，用于阐述本章节中所包含的专业词汇。书中保留了概念检查，它提醒学生在进行下一章节学习之前应当停下来进行复习。在每个章节的最后，仍然会有复习题以及应用性学习问题。本书最后附有总词汇表和索引*。

传统的专题材料（boxed material）被放在了第 11 版 BBOM 新的“知识窗”（microbial sidebars）中，这些丰富的插图被设计成并写成了围绕章节核心内容的“有趣读物”。BBOM 第 11 版的表格完全进行了重新设计，使其中的内容更容易被理解和组织。因为像微生物学这样的学科非常依赖表格，新的表格的设计应该更适合学生和教师的学习和教学。本版中所做的变更使其更符合教育学方法，使教师和学生在阅读本书时都能受益。这包括醒目的标题、能够指引读者从文章到图片并再次回到文章中的红色图标，复习题中使用章节序号进行标注，这能够使得学生在回答每个问题之前及时更新他们的

---

* 本书的词汇表和索引均在随书所附的光盘中。——出版者

记忆。

全书是一个引人入胜的美术工程，每一张图都由一个新的工作室进行了美术设计，使彩图更加明亮、与众不同，和以前的图相比更加华美、吸引人、准确一致和具有教育性。此外，在第 11 版中第一次使用了高质量的、光滑的纸张对许多著名的显微照片及其他照片进行了印制，这是本书自第 1 版以来的传统。我们在图片中加入了明显的“能量箭头”，使读者能够快速发现我们提供的教学帮助。例如，在细胞反应中产生和消耗 ATP 的步骤，我们使用“能量箭头”——明亮的红色波浪箭头对这个反应进行标注来提醒学生。

尽管第 11 版 BBOM 要比前一版本在篇幅上要短，但它却包含新的内容。在每一章节中都能够找到新加入的内容，我们概略了该书中所包含的新内容：氧气的毒性形式（第 6 章）；σ 因子的多样性，一致序列，以及其他 RNA 聚合酶（第 7 章）；应急反应（第 8 章）；RNA 调节和核糖开关（第 8 章）；亚病毒颗粒（第 9 章）；远古生命形式的碳和能量代谢（第 11 章）；纳米古生菌的生物学（第 13 章）；RNA 加工和核酶（第 14 章）；线性 DNA 的复制（第 14 章）；基因组注释（第 15 章）；生物信息学分析和原核生物基因分布（第 15 章）；微阵列和转录组学（第 15 章）；古生菌病毒（第 16 章）；环境基因组学（第 18 章）；感染中的宿主危险因子（第 21 章）；流感、感冒和败血病（第 22 章）；自然免疫（第 22 章）；受体和免疫（第 23 章）；西尼罗病毒（第 27 章）；生物采样以及食物中毒（第 29 章）；严重急性呼吸系统综合征（第 25 章）；作为生物武器的炭疽（第 25 章）以及发酵食品（第 29 章）。

第 11 版 BBOM 配有一些补充材料*，其中包括一个网站（www. prenhall. com/madigan），提供在线多媒体资源、练习测试问题以及补充资源。对于教师来说，一张以 PowerPoint 格式含有书中所有表格和图片的 CD 是必要的，它将有利于提升课堂学习的积极性。对于那些在教室中应用这些内容的教师来说，幻灯片也是可以获得的。事实上，第 11 版 BBOM 的教师工具包为清晰、具有吸引力和激励性的教学发展提供了非常有用的工具。

致谢

您所见到的最终版本是许多人共同努力的结果。其中包括 Prentice Hall / Pearson 出版社的许多工作人员，特别是总编辑 Gary Carlson 和他的助手 Susan Zeigler 和 Jennifer Hart，以及著名的制作编辑 Debra Wechsler。Gary 是这个版本编辑时的指路明灯，而 Susan、Jennifer 和 Debra 维持着这项工作的进度，分别是这本书编辑和完成的“胶合剂”。同样要感谢 Ed Thomas（制作）在早期进行了辅助制作的工作。作者衷心地感谢为本书做美术工作的 Kenny Beck 和 Jay McElroy 以及多媒体编辑 Patrick Shriner 和 Crissy Dudonis，感谢 Jane Loftus（Clackamas，OR）针对整个手稿所做的优秀的编辑工作。

作者同样要感谢发行编辑 Jon Haber（New York，NY），专业助理并提供电子显微镜照片的 Deborah O. Jung（Carbondale，IL）以及校对者 Elizabeth McPherson

* 原书所配的补充材料未收录于本中译版中。——出版者

(University of Tennessee)和 David Crowley (University of California-Riverside)。本书封面上华丽的共聚焦显微照片则需要感谢 Gernot Arp 和 Christian Boeker，Universität Göttingen，Germany 以及 Carl Zeiss 公司，Jena，Germany。

我们两位作者还要感谢他们的研究生、同事和微生物学系成员在本书编写过程中的帮助和耐心。同样还要感谢我们的妻子 Nancy 和 Judy，在第 11 版 BBOM 的编写过程中由于作者需要大量的时间而不能同她们共度，但她们却表现出无尽的耐心，她们的爱、理解和支持使得作者能够在大量的工作中投入必要的时间。

最后，我们还要感谢许多个人的帮助，他们为本书的初稿进行了评阅或提供了新照片。名单如下：

Laurie Achenbach, *Southern Illinois University*
Richard Adler, *University of Michigan-Dearborn*
Karen Aguirre, *Clarkson University*
Stephen Aley, *University of Texas-El Paso*
Mary Allen, *Hartwick College*
Ricardo Amils, *University Autonoma, Madrid, Spain*
Robert Andrews, *Iowa State University*
Michael Benedik, *Taxas A&G University*
David Boone, *Portland State University*
Matt Boulton, *University of Michigan*
Cheryl Broadie, *Southern Illinois University*
Jean Cardinale, *Alfred University*
Jannice Carr, *Centers for Disease Control and Prevention-Atlanta*
David Clark, *Southern Illinois University*
Rhonda Clark, *University of Calgary*
Morris Cooper, *Southern Illinois University School of Medicine*
David Crowley, *University of California-Riverside*
Mark Davis, *University of Evansville*
Michael Davis, *Central Connecticut State University*
Dennis Dean, *Virginia Tech University*
Arvind Dhople, *Florida Institute of Technology*
Biao Ding, *Ohio State University*
Rodney Donlan, *Centers for Disease Control and Prevention-Atlanta*
Paul Dunlap, *University of Michigan*
Paul Edmonds, *Georgia Institute of Technology*
Elizabeth Ehrenfeld, *Southern Maine Community College*
Bruce Farnham, *Metropolitan State University-Denver*
Rebecca Ferrell, *Metropolitan State University-Denver*
Doug Fix, *Southern Illinois University*
Niels-Ulrik Frigaard, *Pennsylvania State University*

George Garrity, *Michigan State University*
Claire Geslin, *Université de Bretagne Occidentale*, *France*
Eric Grafman, *Centers for Disease Control and Prevention-Atlanta*
Bonita Glatz, *Iowa State University*
Ricardo Guerrero, *University of Barcelona*, *Spain*
John Haddock, *Southern Illinois University*
Martin Hanczyc, *Harvard University*
Ernest Hanning, *University of Texas-Dallas*
Pamela Hathorn, *Midwestern University*
John Hayes, *Woods Hole Oceanographic Institution*
Lee Hughs, *University of North Texas*
Michael Ibba, *Ohio State University*
Johannes Imhoff, *Universität Kiel*, *Germany*
Mary Johnson, *Indiana University*
Deborah Jung, *Southern Illinois University*
Judy Kandel, *California State University-Fullerton*
Patrick Keeling, *University of British Columbia*
Joan Kiely, *SUNY-Stonybrook*
Arthur Koch, *Indiana University*
Allan Konopka, *Purdue University*
Vikki Kourkouliotis, *National Renewable Energy Laboratory*
Susan F. Koval, *University of Western Ontario*
Harry Kurtz, *Clemson University*
Sharon Long, *University of Massachusetts*
Bonnie Lustigman, *Montclair State University*
Mark Martin, *Occidental College*
William McCleary, *Brigham Young University*
Elizabeth McPerson, *University of Tennessee*
Ohad Medalia, *Max Planck Institut für Biochemie*, *Germany*
Jianghang Meng, *University of Maryland*
Eric Miller, *North Carolina State University*
Abraham Minisky, *Weizmann Institute of Science*, *Israel*
Ivan Oresnik, *University of Manitoba*
Jörg Overmann, *University of Munich*, *Germany*
Norm Pace, *University of Colorado*
Jack Parker, *Southern Illinois University*
Laurence Pelletier, *Max Planck Institut für Cell Biologie und Genetiks*, *Germany*
Michael Pfaller, *University of Iowa*
Reinhard Rachel, *Universität Regensburg*, *Germany*

Michael Rappe, *Oregon State University*
Chris Rensing, *University of Arizona*
Frank Roberto, *Idaho Environmental and Engineering Labs*
Craig Rouskey, *Southern Illinois University*
Jill Zeilstra Ryalls, *Oakland University*
Herb Schelhorn, *McMaster University*
Berhard Schink, *Universität Jonstanz, Germany*
Heide Schulz, *University of California-Davis*
Kate Scow, *University of California-Davis*
James Shapleigh, *Cornell University*
Jolynn Smith, *Southern Illinois University*
Jerry Sipe, *Adnerson University*
Nancy Spear, *Murphysboro, Illinois*
Julia Thompson, *American Society for Microbiology*
Sonia Tiquia, *University of Michigan*
David Tison, *Multicare Health Systems*
Paul Tomasek, *California State University-Northridge*
Amy Treonis, *Creighton University*
Michael Wagner, *University of Vienna, Austria*
David Ward, *Montana State University*
Joy Watts, *University of Maryland*
Mary Watwood, *Northern Arizona University*
Susan Wells, *Affymetrix, Santa Clara, California*
Carl Woese, *University of Illinois*
Gordon Wolfe, *California State University-Chico*
Alexander Worden, *University of Miami*
Mark Young, *Montana State University*
Stephen Zinder, *Cornell University*

书中所有的错误都是作者的责任。在过去的版本中，读者在使用中遇到错误总会与我们联系。尽管我们希望本书中不存在错误，但是没有哪本书能做到这点。所以，读者在第 11 版的使用过程中如果发现错误，也请与我们联系。我们希望您能喜欢本书。

Michael T. Madigan (madigan@micro. siu. edu)
John M. Martinko (martinko@micro. siu. edu)

（潘　皎　译，李明春　校）

简要目录

第一部分　微生物学基础

第二部分　进化微生物学和微生物多样性

第三部分　代谢多样性和微生物生态学

第四部分　免疫学、致病性和宿主反应

第五部分　微生物疾病

第六部分　以微生物进行工业生产和科学研究

目　　录

第三部分　代谢多样性和微生物生态学

第四部分 免疫学、致病性和宿主反应

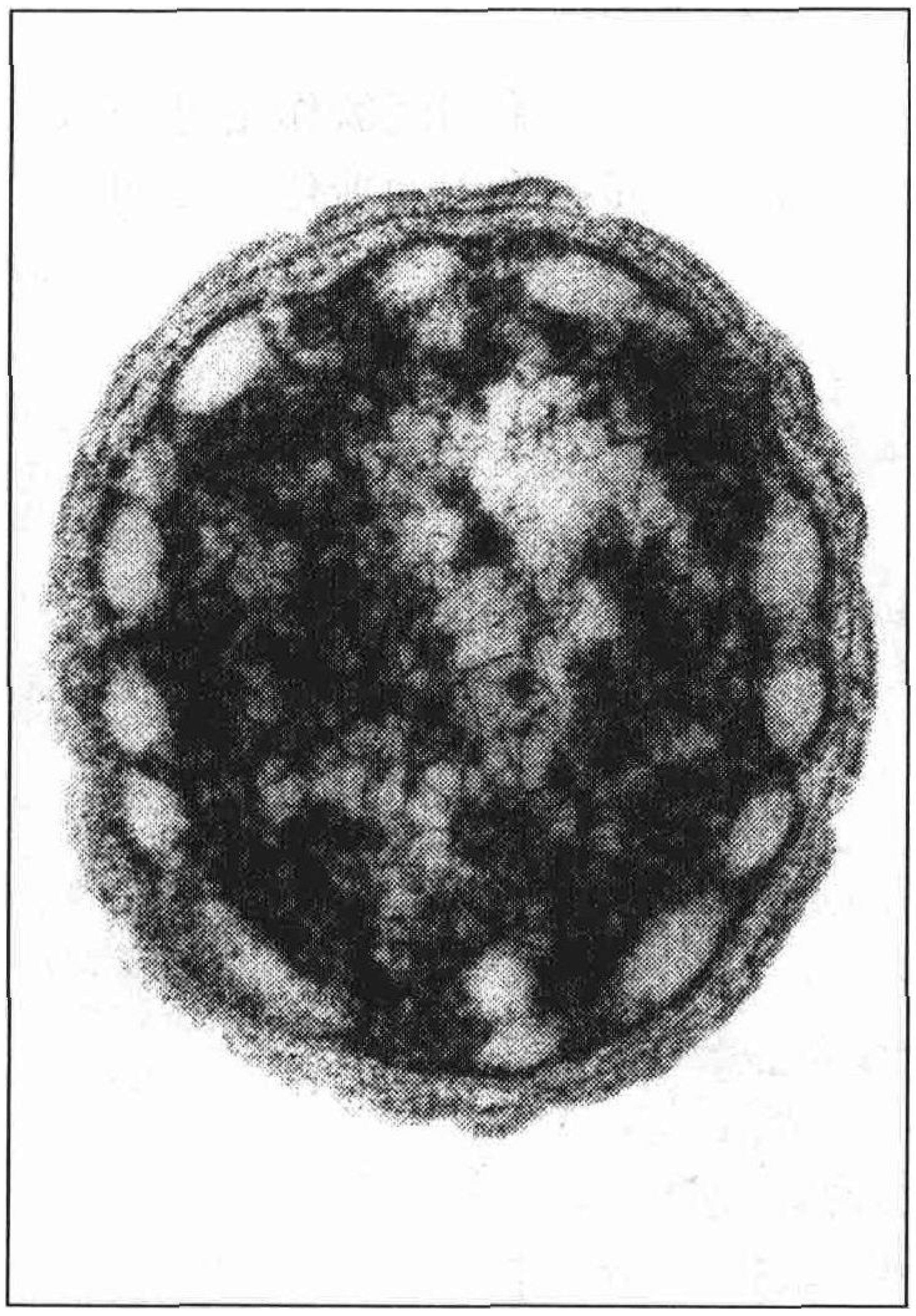
第六部分　以微生物进行工业生产和科学研究

第三部分

代谢多样性和微生物生态学

17

代谢多样性



原核生物的遗传多样性可从其代谢多样性反映出来。绿色硫细菌是光养生物，含有绿色体，如图中所示的存在于绿硫菌（*Chlorobium tepidum*）细胞周围的雪茄形组织。绿色体使绿色细菌可以在任何光养生物所需的最弱光强度下生长。

Ⅰ 生命的光合营养途径

Ⅱ 化能无机营养：能量来自于无机电子供体的氧化

Ⅲ 生命的厌氧途径：厌氧呼吸

词汇表

厌氧呼吸（anaerobic respiration）：由 SO_4^{2-} 或 NO_3^- 等物质代替 O_2 作为最终电子受体的呼吸作用

厌氧氨氧化（anammox）：无氧条件下氨的氧化

无氧的（anoxic）：无氧存在

不生氧光合作用（anoxygenic photosynthesis）：不产生 O_2 的光合作用

天线色素（antenna）：在光复合物中，将能量传递至反应中心的捕光色素分子

自养生物（autotroph）：以 CO_2 为唯一碳源的生物

细菌叶绿素（bacteriochlorophyll）：不产氧光养生物的叶绿素色素

卡尔文循环（Calvin cycle）：在许多自养生物中存在的固定 CO_2 的生化途径

羧酶体（carboxysome）：RubisCo（1，5-二磷酸核酮糖羧化酶）的晶状包涵体

类胡萝卜素（carotenoid）：在光合作用膜中与叶绿素并存的疏水性辅助色素

化能无机营养生物（chemolithotroph）：能够氧化无机物作为能源的微生物

叶绿素（chlorophyll）：光合生物中启动光合磷酸化过程的含镁的卟啉化合物，对光敏感

绿色体（chlorosome）：雪茄形组织，存在于绿色硫细菌和绿色非硫细菌细胞周围，含有天线色素细菌叶绿素（c、d 或 e）

反硝化作用（denitrification）：在厌氧呼吸中 NO_3^- 被还原成气态的氮化合物，主要为 N_2

歧化反应（disproportionation）：一个化合物分裂成两个新的化合物的反应，其中一个比原始化合物更容易被氧化，另一个更容易被还原

发酵（fermentation）：有机物的厌氧分解代谢，在此过程中，该化合物既作为电子供体又作为电子受体，通过底物水平磷酸化产生 ATP

乙酸生成作用（homoacetogenesis，acetogenesis）：从 H_2 和 CO_2 或者从有机物生成乙酸的能量代谢

氢化酶（hydrogenase）：广泛分布于厌氧微生物中的一种酶，能够吸收或释放 H_2

羟丙酸途径（hydroxypropionate pathway）：一种自养的途径，于绿屈挠菌属和少数古生菌中发现

产甲烷作用（methanogenesis）：甲烷（CH_4）的生物合成

甲烷营养菌（methanotroph）：能够氧化甲烷的微生物

甲基营养菌（methylotroph）：能够生长在含有非 C—C 键化合物中的微生物

混合营养（mixotrophic）：一种营养状态，在此状态中以无机物作为能源（电子供体），有机物作为碳源

单加氧酶（monooxygenase）：此酶催化 O_2 的一个原子结合到底物中，而另一个原子被还原成 H_2O

硝化作用（nitrification）：微生物将 NH_3 转化成 NO_3^- 的过程

固氮酶（nitrogenase）：在固氮过程中能将 N_2 还原成 NH_3 的酶

固氮作用（nitrogen fixation）：固氮酶催化的将 N_2 还原成 NH_3 的生物学过程

生氧光合作用（oxygenic photosynthesis）：通过蓝细菌和绿色植物进行的光合作用，在此过程中释放 O_2

光合磷酸化（photophosphorylation）：光合作用中产生 ATP 的过程

光合作用（photosynthesis）：通过光驱动的反应合成 ATP 以及将 CO_2 固定于细胞物质中的系列反应

光养生物（phototroph）：能利用光作为能源的生物

藻胆蛋白（phycobiliprotein）：蓝细菌中的辅助色素复合物，由 1 分子的藻青素或藻红素与蛋白质耦合组成

反应中心（reaction center）：光合作用复合物，含有叶绿素（或细菌叶绿素）和几种其他的组成部分，在复合物中发生光合作用电子流最初的电子转移反应

还原脱氯作用（reductive dechlorination）：以氯化的有机物作为电子受体的厌氧呼吸作用，通常释放出 Cl^-

反向电子运输（reverse electron transport）：电子依靠能量逆热力学梯度移动，使较弱的电子供体形成强的还原剂

RubisCO：二磷酸核酮糖羧化酶的缩写，卡尔文循环的一个关键酶

互养共栖（syntrophy）：两种或两种以上的微生物共同降解一种底物的过程，任何一种微生物均不能单独降解该底物

前面我们探讨了地球上微生物系统发生（phylogenetic）的多样性，下面将重点讨论微生物的代谢（metabolic）多样性，尤其侧重于代谢多样性的生化过程，然后研究微生物生态学——微生物之间、微生物与环境之间的相互作用。代谢多样性和微生物生态学密切相关，本章所描述的代谢多样性推动了营养循环和微生物的其他活动，这些我们将在第 18 章和第 19 章中讨论。我们将会了解到，微生物以及它们的代谢反应在维持地球生命网络中确实起着关键作用，对农业和人类社会活动的其他方面有着非常重要的意义（见 1.4 节）。

Ⅰ 生命的光合营养途径

光合营养（phototrophy），即以光作为能源，在微生物世界中广泛存在。在前 5 节中，我们讨论光合营养的主要形式，包括可产生我们呼吸所需要的氧气的光合营养类型，然后了解大多数光养生物如何利用 CO_2 来满足它们所需的所有碳元素。

17.1 光合作用

地球上最重要的生物过程就是光合作用（photosynthesis），可将光能转变为化学

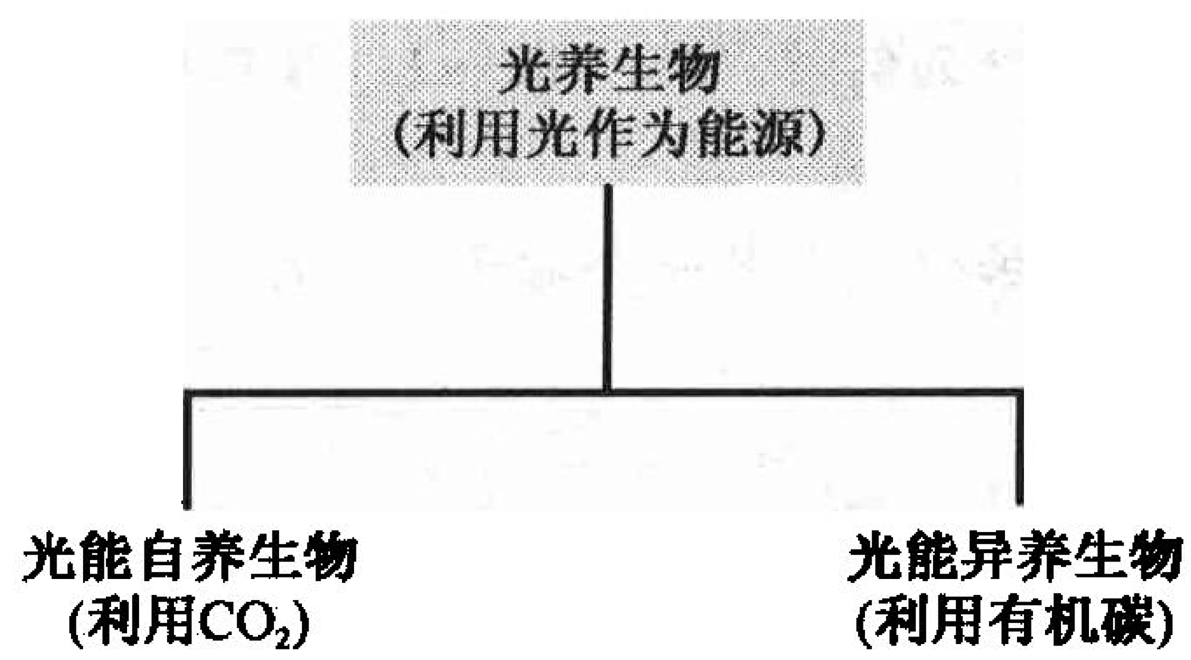


图 17.1 按照能源和碳源对光养生物进行分类。自然界中，光养生物根据生境可利用的资源变换代谢模式，光能异养通常抑制光能自养。

能。能进行光合作用的生物叫光养生物（phototroph）（图 17.1）。大部分光养生物也是自养生物（autotroph），能够以 CO_2 作为唯一碳源生长，利用光能将 CO_2 还原成有机化合物（光能自养，photoautotrophy）。也有一些光养生物以有机碳作为碳源，这种生活方式被称为光能异养（photoheterotrophy）（图 17.1）。

能够进行光合作用需要有光敏感色素——叶绿素（chlorophyll），叶绿素存在于植物、藻类和几类原核生物中。光以不连续的称为量子（quanta）的能量单位到达光养生物中，通过叶绿素吸收光量子开始了光合作用的能量转换过程，所得净能量为 ATP。

能量产生和 CO_2 的同化

光能自养生物的生长以两组不同的反应为特征：①ATP 的产生；②CO_2 还原为有机化合物。对自养生长，能量由 ATP 供给，来自 NADH（或 NADPH）的电子用于 CO_2 的还原。NADH（或 NADPH）则是由来自多种电子供体的电子还原 NAD^+（或 $NADP^+$）产生的，这点将在以后讨论。

为了驱动自养反应，有些光养细菌从周围环境中存在的电子供体获得还原力，典型的电子供体如还原态硫源（H_2S、S^0、$S_2O_3^{2-}$）或 H_2。与之相反，绿色植物、藻类和蓝细菌利用 H_2O 这一弱的电子供体（图 5.9）为还原力，将 $NADP^+$ 还原为 NADPH，水分子氧化后产生氧分子（O_2）作为副产物（图 17.2）。由于产生 O_2，这些生物进行的光合作用称为生氧（oxygenic）光合作用。许多光养细菌不产生 O_2，因此所进行的光合作用称为不生氧光合作用（anoxygenic photosynthesis）。不产氧光养生物从类似 H_2S 等物质产生 NADH 时，根据生物体的不同，可以直接由光驱动，也可以间接由光驱动。而产氧光养生物则总是由光驱动将 H_2O 氧化为 O_2（图 17.2）。因此，产氧光养生物还原力的产生和能量保存均需要光。

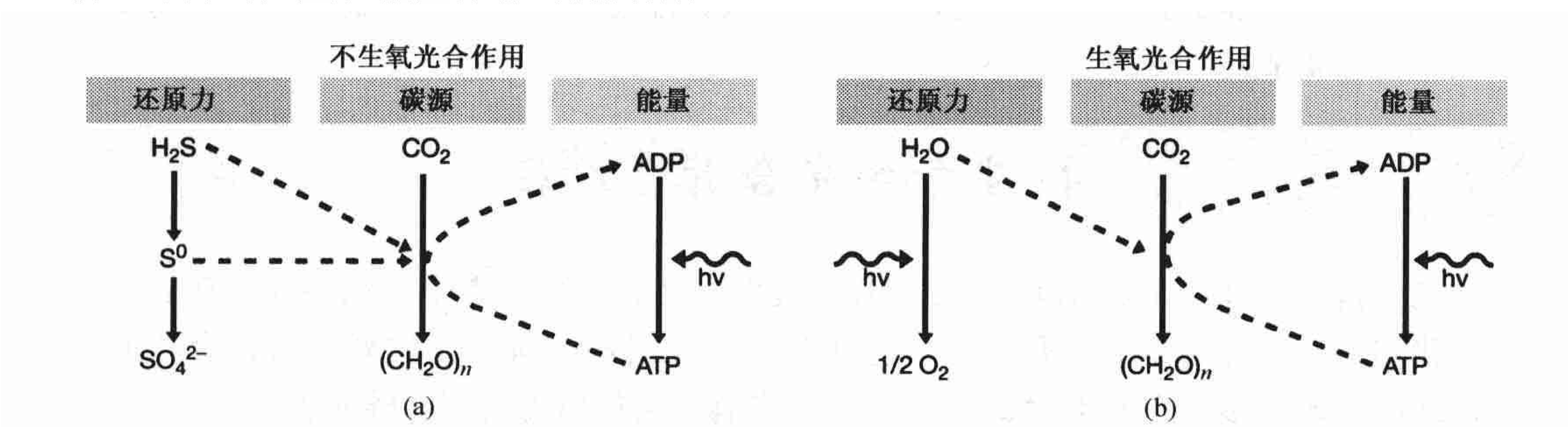


图 17.2 光合作用类型。（a）不产氧光养生物与（b）产氧光养生物能量和还原力合成的对比。尽管两种光养生物都是从光（hv）获得能量，但是在产氧光养生物中，光还驱动着将 H_2O 氧化为 O_2 的过程。

概念检查

光养生物从光中获得能量，光合作用包括产生 ATP 的反应以及消耗 ATP 利用 NADH 还原 CO_2 的反应。

◆ 光能自养和光能异养的相似点是什么？如何区分？

◆ 产氧光养生物和不产氧光养生物的根本区别是什么？

17.2 光合色素及其细胞内定位

光合作用仅在具有某种叶绿素（产氧光养生物）或细菌叶绿素（bacteriochlorophyll）（不产氧光养生物）的生物中发生。与细胞色素（见 5.11 节）一样，叶绿素是一种卟啉化合物，但是与细胞色素不同的是，叶绿素在卟啉环的中心含有 1 个镁原子而不是 1 个铁原子。叶绿素含有特殊的取代基与卟啉环键合，此外还含有一个疏水的醇基侧链，使叶绿素可以与光合作用膜上的脂类和疏水蛋白质相结合。

叶绿素 a 是高等植物、大部分藻类和蓝细菌的主要叶绿素，其结构见图 17.3a。叶绿素 a 是绿色的，因为它优先吸收红光和蓝光而透过绿光。在 10.4 节中我们提到了电磁谱，任一色素的光谱特性都可通过它的吸收光谱（absorption spectrum）很好地表现出来，吸收光谱能够表明色素对不同波长光的吸收程度。含有叶绿素 a 的细胞的吸收光谱表现为强烈吸收红光（在 680nm 处有最大吸收值）和蓝光（在 430nm 处有最大吸收值）（图 17.3b）。

叶绿素的多样性

有许多化学性质不同的叶绿素和细菌叶绿素（细菌叶绿素是存在于不产氧光养生物中的叶绿素类型），可以通过它们吸收光谱的不同而加以区别。例如，叶绿素 b 的最大吸收值在 660nm 而不是 680nm。许多植物含有一种以上的叶绿素，但是最常见的是叶绿素 a 和叶绿素 b。

在原核生物中，蓝细菌含有叶绿素 a，而不产氧光养生物（如紫色细菌和绿色细菌），可以含有任意种类的细菌叶绿素（图 17.3 和图 17.4）。存在于多数紫色细菌中（见 12.2 节）的细菌叶绿素 a（图 17.3），其最大吸光值取决于光养生物的种类，可以在 800～925nm 变化。不同的物种含有不同的色素结合蛋白，在某种程度上，细菌叶绿素 a 的最大吸光值取决于这些蛋白质的性质以及在光合作用复合物内的排列方式。沿着系统发育线分布的其他细菌叶绿素，在可见光和红外光的其他区域有最大吸收（图 17.4）。

为什么不同的生物体具有不同种类的叶绿素，在不同的波长处吸收光呢？这可能是为了更好地利用电磁光谱能量的一个策略，只有被吸收的光能才能用于能量储存。所以，两个生物体通过含有不同的色素，可以利用不同波长的光，这样就能够共存于一个生境中。因此，色素的多样性在生态学上具有重要意义。

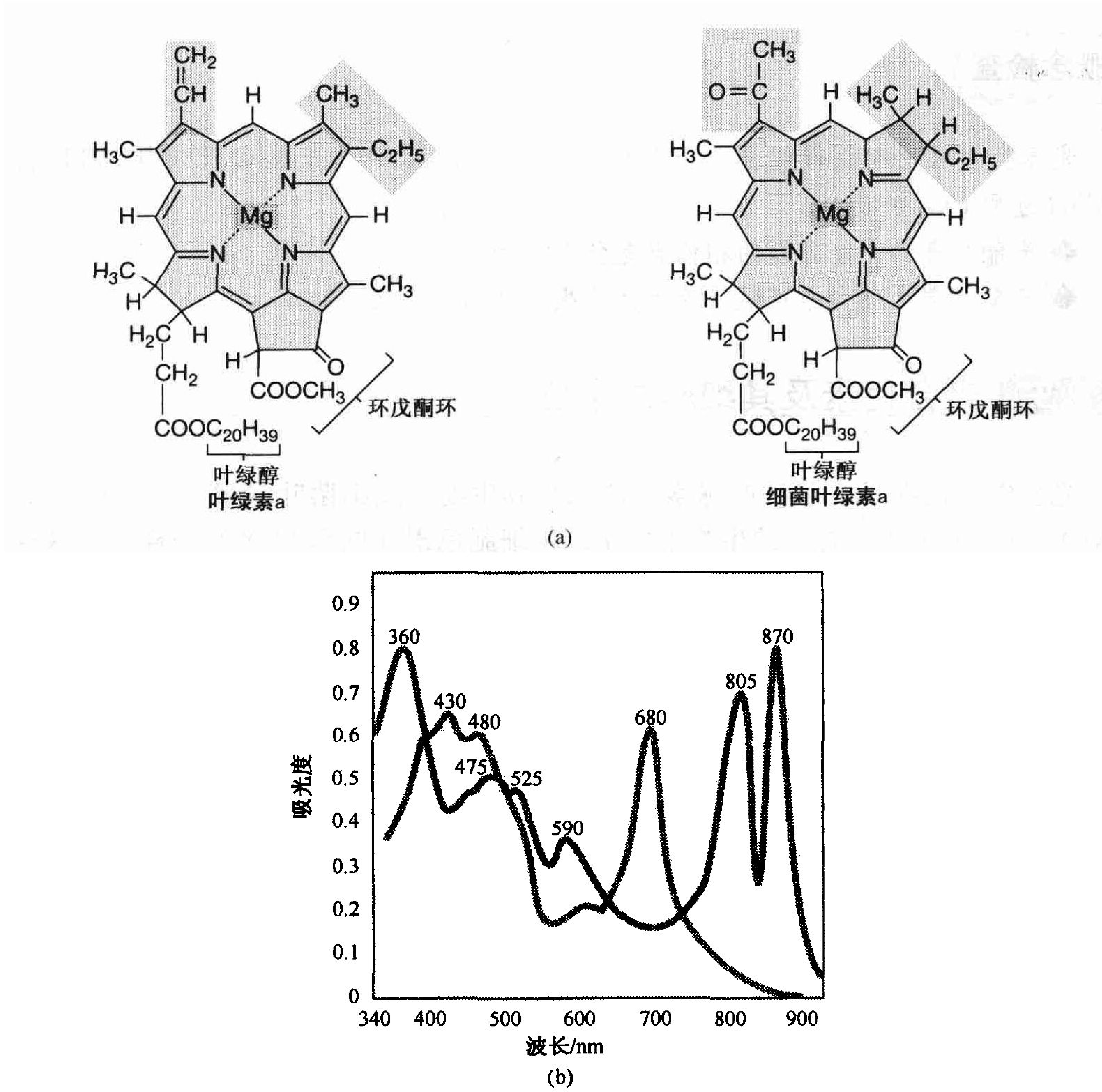
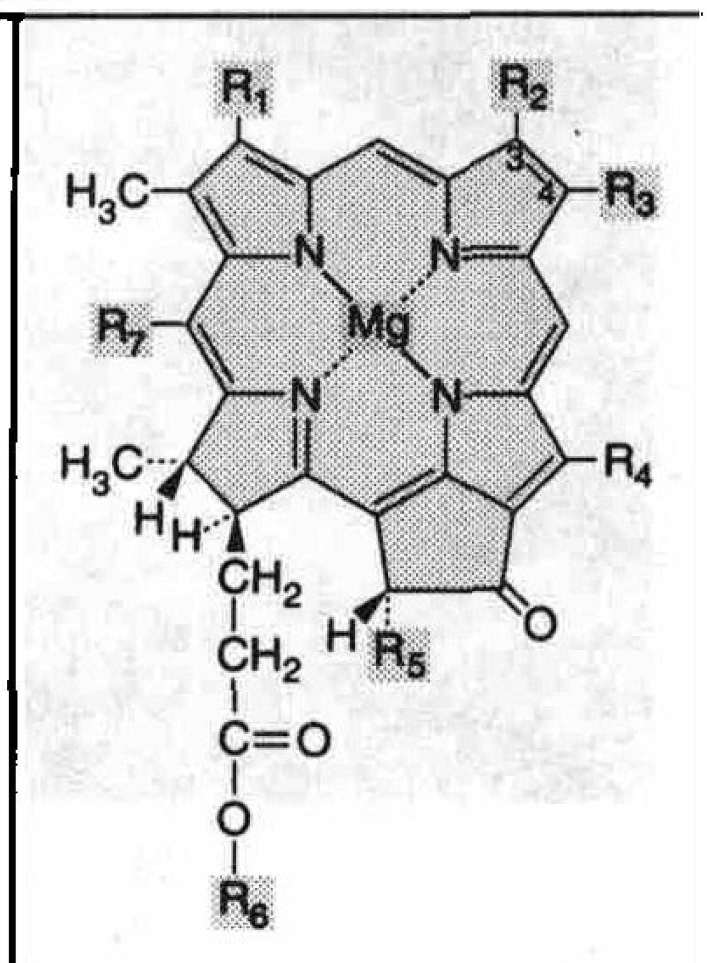


图 17.3 叶绿素 a 和细菌叶绿素 a 的结构与吸收光谱。 (a) 除了以黄色和绿色作为对比的部分外，这两个分子的其他部分是相同的。 (b) 绿色曲线是绿藻衣藻 (*Chlamydomonas*) (见 14.13 节) 细胞的吸收光谱，在 680nm 和 430nm 处出现的峰是叶绿素 a，在 480nm 处出现的峰是类胡萝卜素；红色曲线是光养型紫色细菌沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*) (见 12.2 节) 细胞的吸收光谱，在 870nm、805nm、590nm 和 360nm 处出现的峰是细菌叶绿素 a，在 525nm 和 475nm 处出现的峰是类胡萝卜素。

光合膜和叶绿体

叶绿素以及集光器的所有其他组分位于细胞内特殊的膜系统，即光合膜 (photosynthetic membrane) 内。在原核微生物和真核微生物中，光合膜在细胞中的位置是不同的。在真核生物中，光合作用和细胞内特殊的细胞器——叶绿体 (chloroplast) 有关 (图 17.5a，见 14.3 节)，叶绿素附着在叶绿体的片层膜结构上 (图 17.5b)，这些光合膜系统被称为类囊体 (thylakoid)，类囊体堆积起来形成基粒 (grana) (图 17.5b)。类

色素/最大吸收波长(体内)	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
Bchl a (紫色细菌)/805,830~890	$-C(=O)-CH_3$	$-CH_3$[b]	$-CH_2-CH_3$	$-CH_3$	$-C(=O)-O-CH_3$	P/Gg[a]	$-H$
Bchl b (紫色细菌)/835~850,1020~1040	$-C(=O)-CH_3$	$-CH_3$[c]	$=CH-CH_3$	$-CH_3$	$-C(=O)-O-CH_3$	P	$-H$
Bchl c (绿色硫细菌)/745~755	$-CH(OH)-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$[d] $-C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$	$-H$	F	$-CH_3$
Bchl c_s (绿色非硫细菌)/740	$-CH(OH)-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$	$-CH_3$	$-H$	S	$-CH_3$
Bchl d (绿色硫细菌)/705~740	$-CH(OH)-CH_3$	$-CH_3$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$ $-CH_3$	$-H$	F	$-H$
Bchl e (绿色硫细菌)/719~726	$-CH(OH)-CH_3$	$-C(=O)-H$	$-C_2H_5$ $-C_3H_7$ $-C_4H_9$	$-C_2H_5$	$-H$	F	$-CH_3$
Bchl g (阳光杆菌)/670,788	$-CH=CH_2$	$-CH_3$[b]	$-C_2H_5$	$-CH_3$	$-C(=O)-O-CH_3$	F	$-H$



[a]P,叶绿酯($C_{20}H_{39}O-$);F,法尼酯($C_{15}H_{25}O-$);Gg,香叶酯($C_{10}H_{17}O-$);S,十八烷醇($C_{18}H_{37}O-$)

[b]在C_3和C_4间无双键;在C_3和C_4位各多1个氢原子

[c]在C_3和C_4间无双键;在C_3位多1个氢原子

[d]细菌叶绿素c、d和e均由在R_3位上具有不同取代基的异构混合物组成

图 17.4 所有已知的细菌叶绿素(Bchl)的化学结构。列出了所附化学结构中 R_1~R_7 位的不同取代基。将完整的细胞悬浮于黏性液体中,如 60%的蔗糖(这样可降低光散射,使光谱线平滑),进行吸收光谱扫描(图 17.3),以此可确定吸收光谱特征。细菌叶绿素的体内最大吸收波长与生理相关,通常和溶于有机溶剂中的细菌叶绿素的光谱完全不同。

囊体规则排列而将叶绿体分为两个部分:环绕类囊体的基质空间(matrix space)和类囊体内的内空间(inner space)(图 17.5b),这种排列使得用于合成 ATP 的光驱动质子动力的产生成为可能,这些将在 17.5 节中讲述。

在原核生物中没有叶绿体,光合色素结合在内膜系统中。这些内膜系统来源于:①细胞质膜的内陷(紫色细菌)(图 12.3 和图 17.12);②细胞质膜本身(阳光杆菌,见 12.20 节);③细胞质膜和特殊的非单位膜包被的结构——绿色体(chlorosome)(绿色细菌,图 17.7 和见 12.32 节);④类囊体膜(蓝细菌,见 12.25 节)。

反应中心和天线色素

在光合膜内,叶绿素或细菌叶绿素分子与蛋白质结合形成含有 50~300 个分子的复合体(图 17.6)。只有很少量的被称为反应中心(reaction center)的色素分子直接参与光能向 ATP 的转化(图 17.6)。反应中心叶绿素或细菌叶绿素被更多的集光(light-harvesting)或天线(antenna)叶绿素或细菌叶绿素包围,天线色素的功能是收集光并将能量传递至反应中心(图 17.6)。在自然界常见的低光强度下,这种排列方式可以捕获并利用光量子,否则低光强度下的光量子不足以驱动反应中心的光化学反应。

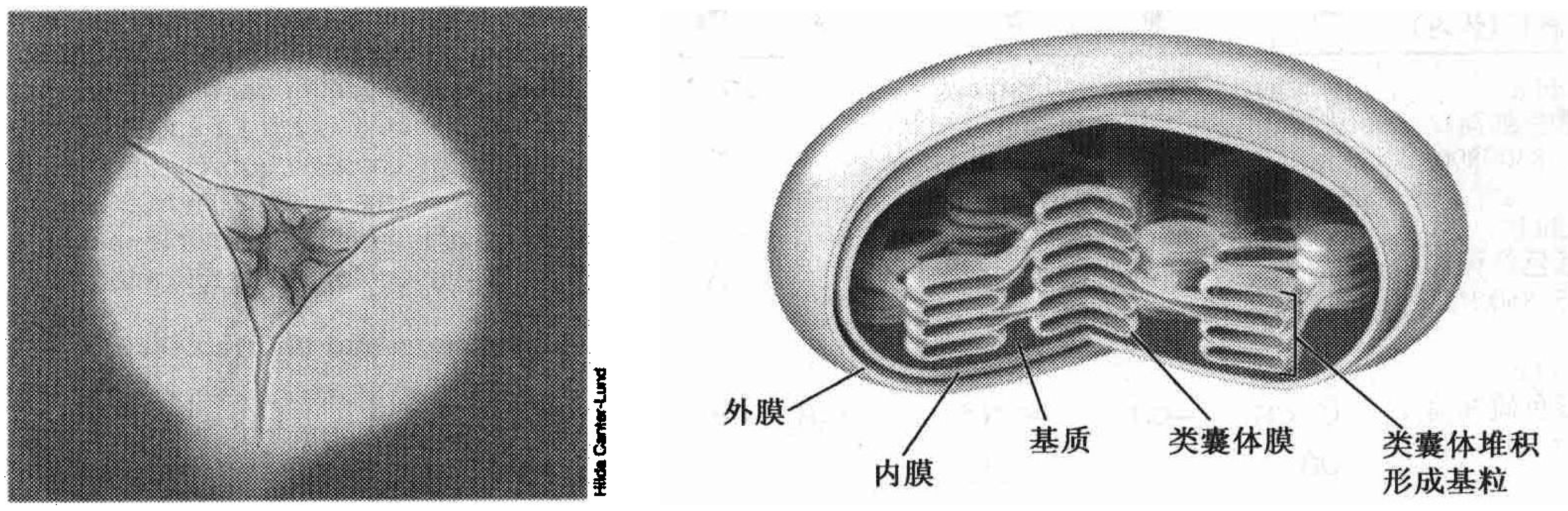


图 17.5　叶绿体。 (a) 藻类细胞叶绿体的显微照片。(b) 叶绿体的详细结构图，显示类囊体膜如何回旋形成内腔——基质，以及形成膜的堆积物——基粒。

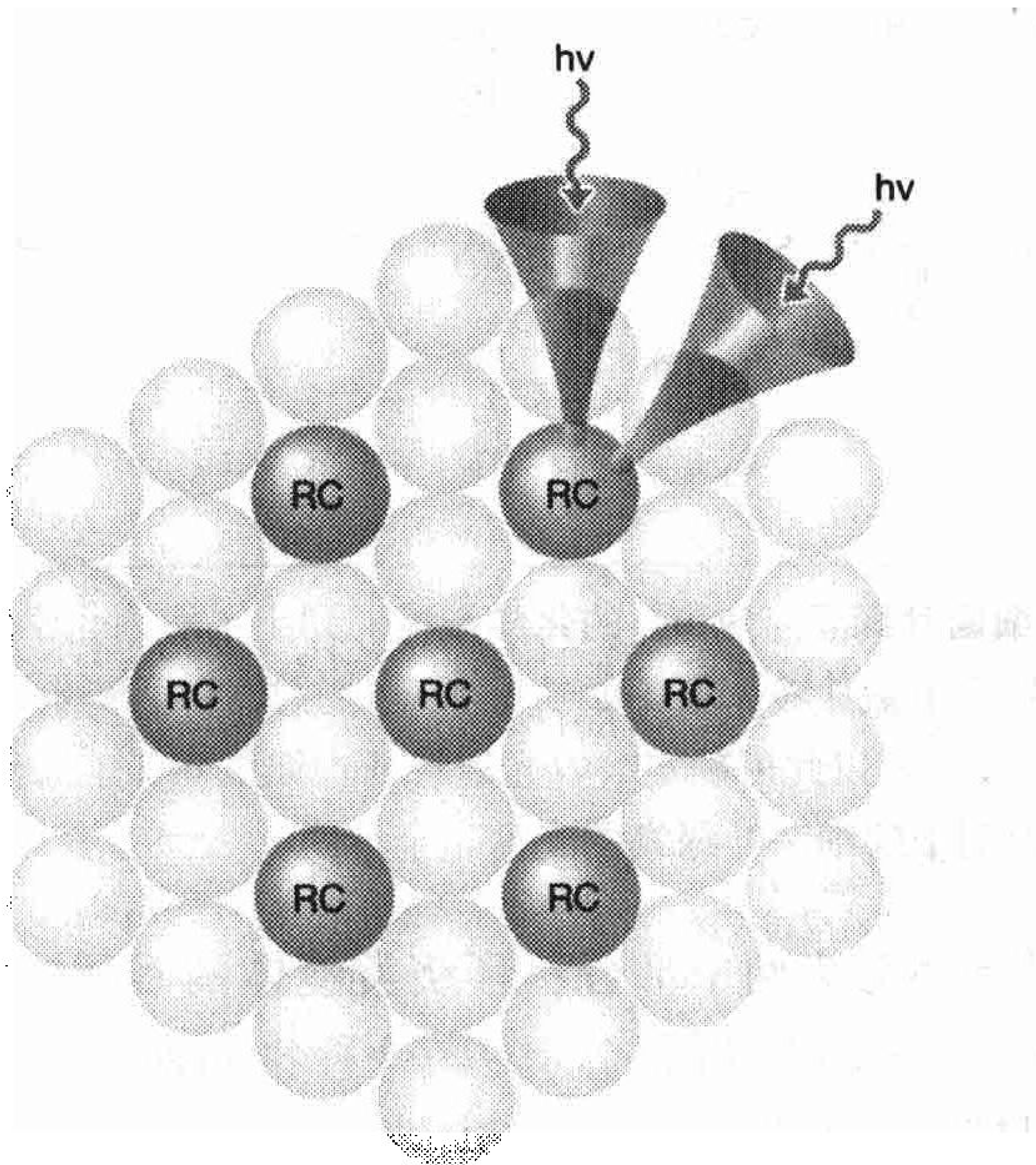


图 17.6　光合膜内集光叶绿素/细菌叶绿素与反应中心的排列模型。 被集光分子（浅绿色）吸收的光能传递给光合作用电子转移反应的起始地反应中心（深绿色，RC），所有色素分子均被特殊的色素结合蛋白固定在膜内，将此图与图 17.13 和图 17.15 进行比较。

绿色硫细菌和绿屈挠菌（*Chloroflexus*）的绿色体对低光照的利用率最高（图 17.7）。绿色体构成了一个巨大的天线系统，但是与其他光养生物的天线色素不同，绿色体中细菌叶绿素分子没有与蛋白质相结合，其功能更像是一个固态电路。绿色体细菌叶绿素（细菌叶绿素 c、d 和 e，图 17.4）吸光后将能量传递给位于反应中心的细菌叶绿素 a，反应中心在细胞质膜内（图 17.7），这种排列方式对在低光强度下吸收光非常有效。从这点来看，绿色硫细菌可以在所有已知光养生物生长所需的最低光强度下生长。

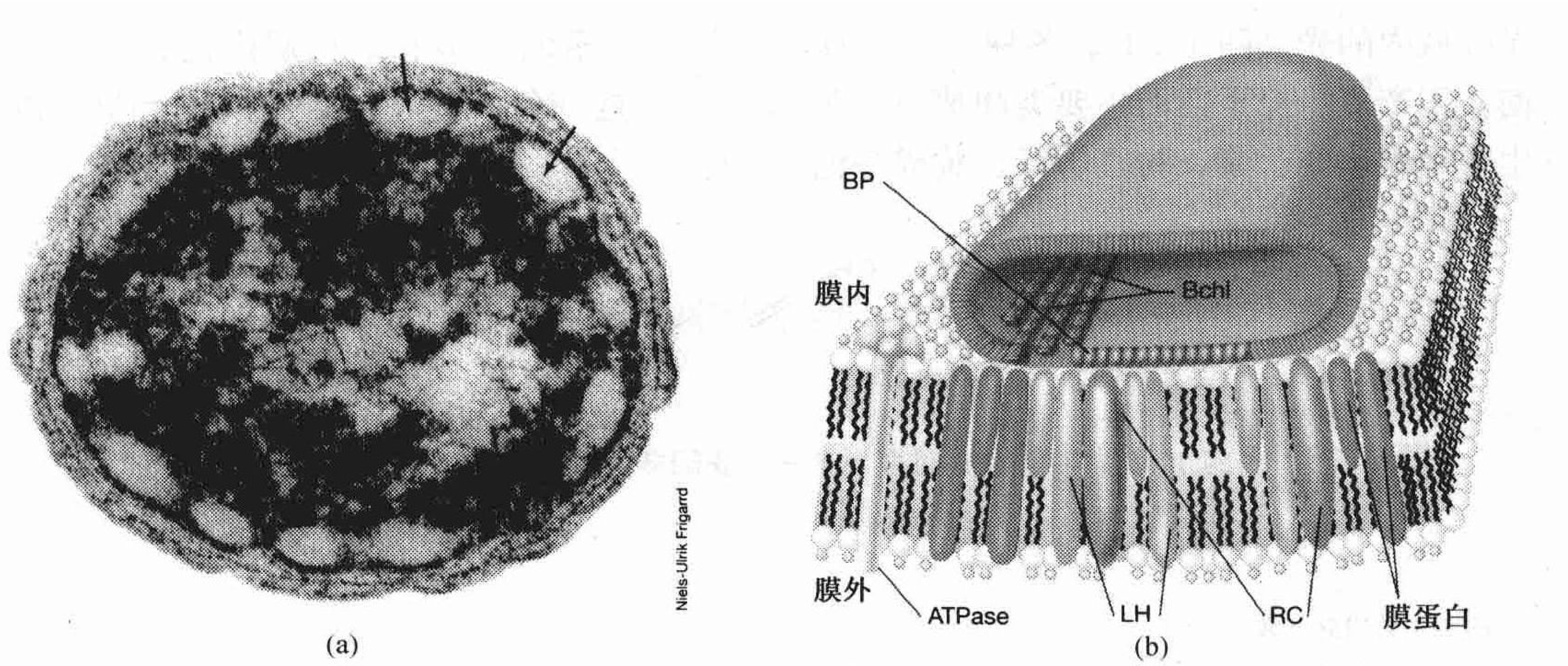


图 17.7　绿色硫细菌和绿色非硫细菌的绿色体。 (a) 绿色硫细菌绿硫菌 (*Chlorobium tepidum*) 细胞的电镜照片，绿色体以箭头标示。(b) 绿色体的结构模型，绿色体（绿色）紧贴细胞质膜的内表面，天线细菌叶绿素 (Bchl) 分子 (Bchl c、d 或 e) 在绿色体内呈管状排列，能量通过集光 Bchl a 分子 (LH) 从这些细菌叶绿素传递至位于细胞质膜内的反应中心 (RC) Bchl a（蓝色）。基底蛋白 (BP) 在绿色体和细胞质膜间起连接作用。

概念检查

光合作用的中心色素是叶绿素（或细菌叶绿素），叶绿素位于光合膜内，光合膜是光合作用中进行光反应的场所，天线叶绿素分子收集光能并将光能传递给反应中心叶绿素。

◆ 从功能上考虑，为什么叶绿素色素必须附着在膜内？

◆ 在光合作用复合物中，天线叶绿素和反应中心叶绿素分子的数量有什么不同？为什么？

◆ 在绿色体内发现的是什么色素？

17.3　类胡萝卜素和藻胆素

虽然叶绿素或细菌叶绿素对光合作用是必需的，光养生物还含有多种辅助色素用于捕捉和处理光能，这些色素包括类胡萝卜素 (carotenoid) 和藻胆素 (phycobilin)，主要起光保护作用（类胡萝卜素）或集光作用（藻胆素）。

类胡萝卜素

分布最广的辅助色素是类胡萝卜素，在光养生物中总是能发现类胡萝卜素。类胡萝卜素是疏水性色素，稳固地嵌入膜内。β-胡萝卜素 (β-carotene) 是典型的类胡萝卜素，其化学结构见图 17.8。类胡萝卜素具有 C—C 和 C═C 键交替排列的长烃链，这种排列被称为共轭双键体系。类胡萝卜素通常呈黄色、红色、棕色或绿色（图 12.2），吸收蓝

光区域内的光（图 17.3）。各种光养生物的类胡萝卜素的类型和结构研究的已经很透彻，不产氧光养生物的主要类胡萝卜素见图 17.9，这些色素使不同种类的不产氧光养生物呈现出红、紫、粉红、绿、黄或棕色等亮丽的颜色（图 12.2 和图 12.5）。

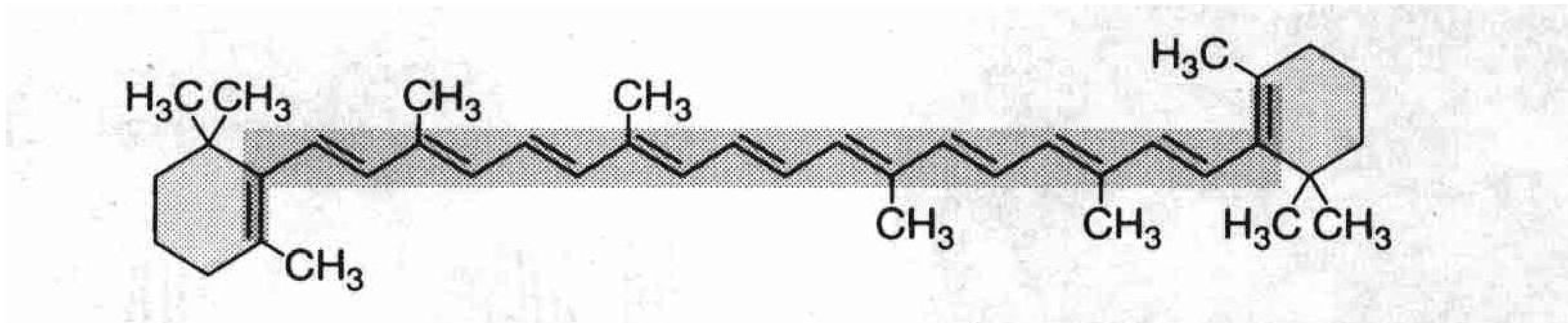


图 17.8 典型的类胡萝卜素——β-胡萝卜素的化学结构。共轭双键体系以橙色突出显示。

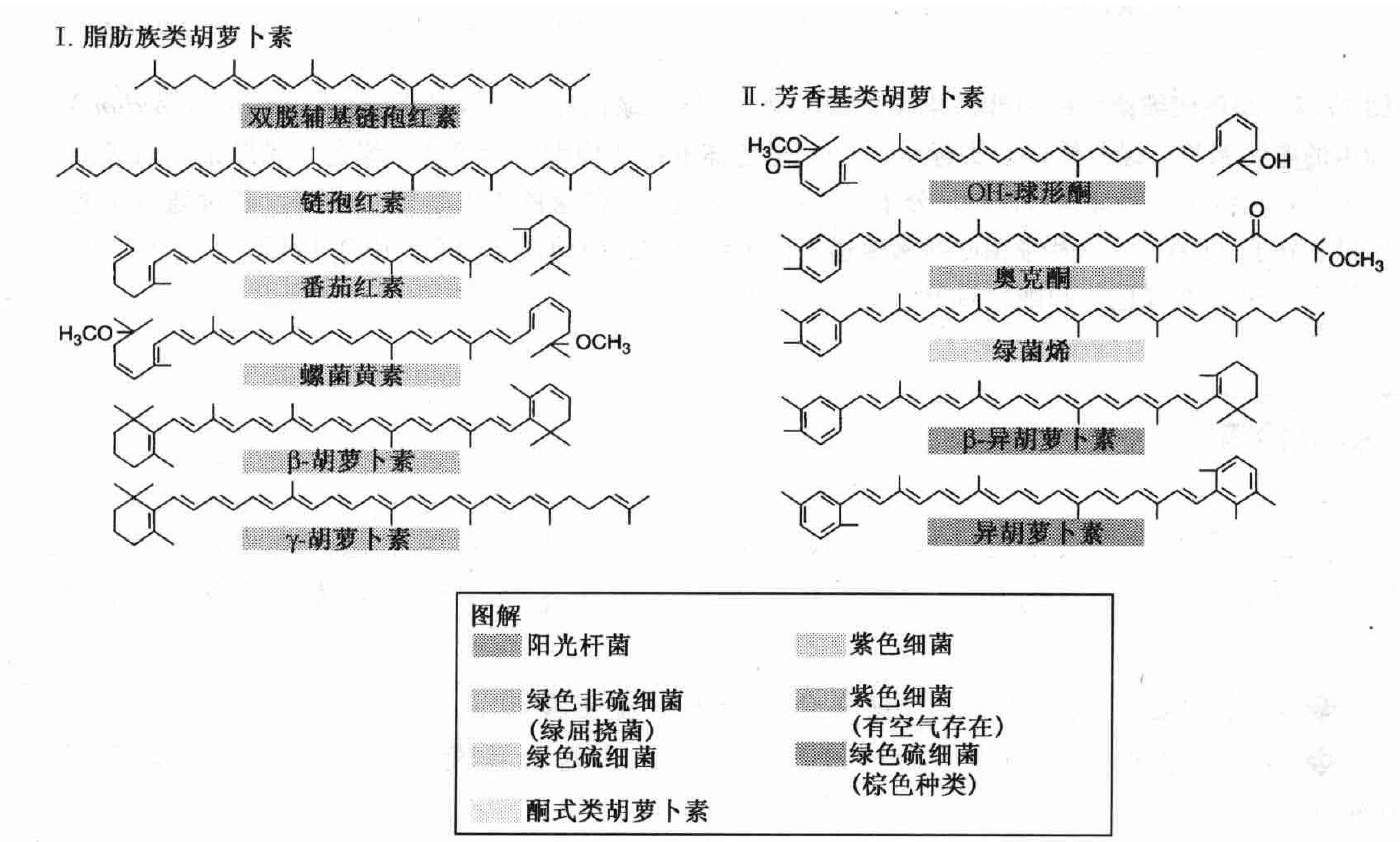


图 17.9 不产氧光养生物中一些常见类胡萝卜素的化学结构。比较图 17.8 与本图所绘制的 β-胡萝卜素的结构。为了简单起见，结构式中甲基（CH_3）仅以化学键表示。芳香族类胡萝卜素与脂肪族类胡萝卜素的明显区别是芳香族类胡萝卜素在末端含有 1 个芳香环。紫色细菌见 12.2 节，阳光杆菌见 12.20 节，绿色硫细菌见 12.32 节，绿色非硫细菌见 12.35 节。

在光合色素复合物中，类胡萝卜素与叶绿素或细菌叶绿素紧密相连，但是类胡萝卜素对 ATP 的合成却不起直接作用。尽管如此，类胡萝卜素能够将能量传递给反应中心，被传递的能量可用于产生 ATP，其方式与叶绿素直接捕获的光能产生 ATP 的方式相同。类胡萝卜素还可以作为光保护剂。强光对细胞有害，因为强光能够催化光氧化反应，产生有毒形式的氧，如单态氧（$^1O_2$）（见 6.16 节），从而氧化并损伤光合器本身。而类胡萝卜素能够淬灭毒性氧，吸收大量这种有害光。由于光养生物原本就必须在光照下生长，因此类胡萝卜素的光保护作用是一个显著的优势。

藻胆蛋白和藻胆体

蓝细菌和红藻的叶绿体中含有藻胆蛋白（phycobiliprotein），藻胆蛋白是这些生物主要的集光（天线）色素。藻胆蛋白呈红色或蓝色，由与蛋白质相耦合的开链四吡咯组成（图 17.10a）。被称作藻红素（phycoerythrin）的红色色素在波长 550nm 左右强烈吸光，而蓝色的色素即藻青素（phycocyanin）（图 17.10a）在 620nm 处吸光最强（图 17.11），第 3 种色素被称为别藻蓝素（allophycocyanin），吸光波长约 650nm。

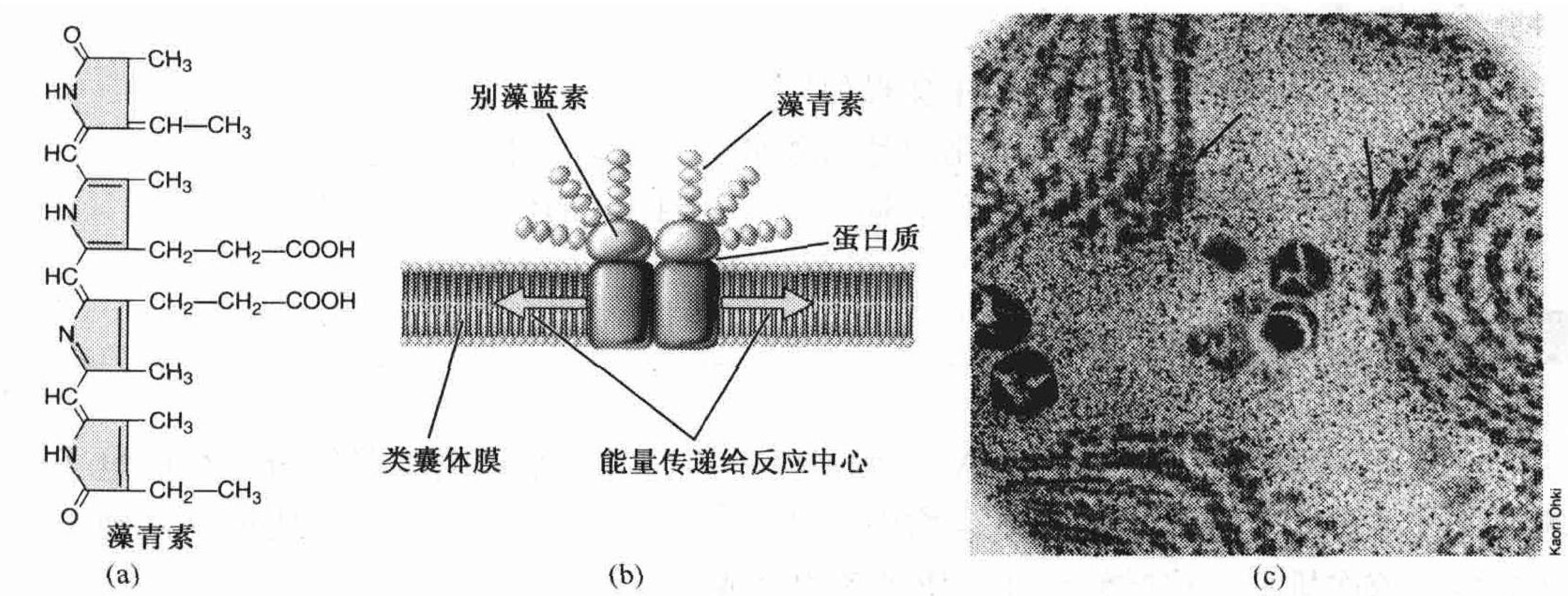


图 17.10 藻胆蛋白和藻胆体。（a）典型的藻胆素。这种化合物是一种开链的四吡咯，是通过生物合成作用由 1 个闭合卟啉环失去 1 个碳原子形成一氧化碳衍生而来，图中显示的是蓝细菌（见 12.25 节）和红藻（见 14.13 节）中藻青素辅基的结构。（b）藻胆体的化学结构。与别藻蓝素相比，藻青素吸收能量较高（波长较短）的光，叶绿素 a 吸收波长较长的光，因此能量流动顺序为：藻青素→别藻蓝素→叶绿素 a。（c）蓝细菌集胞蓝细菌（*Synechocystis*）超薄切片的电子显微照片。注意被染成黑色的球形藻胆体（箭头）附着在片层膜上。

藻胆蛋白以高分子质量聚集体的形式存在，被称为藻胆体（phycobilisome），并且附着在光合膜上（图 17.10b、c），藻胆体的构成方式可使别藻蓝素分子与光合膜发生物理接触。别藻蓝素被藻青素或藻红素分子（或两者，取决于生物体）所包围，后者能吸收波长较短（能量较高）的光，并将能量传给别藻蓝素，而别藻蓝素紧连着反应中心叶绿素，可将能量传给反应中心。可见，藻胆体能够将能量从藻胆蛋白复合物极有效地传递给叶绿素 a，这样可使蓝细菌在相当低的光强度下生长。实际上，蓝细菌细胞内藻胆体的含量也确实会随着光强度的减弱而增加。

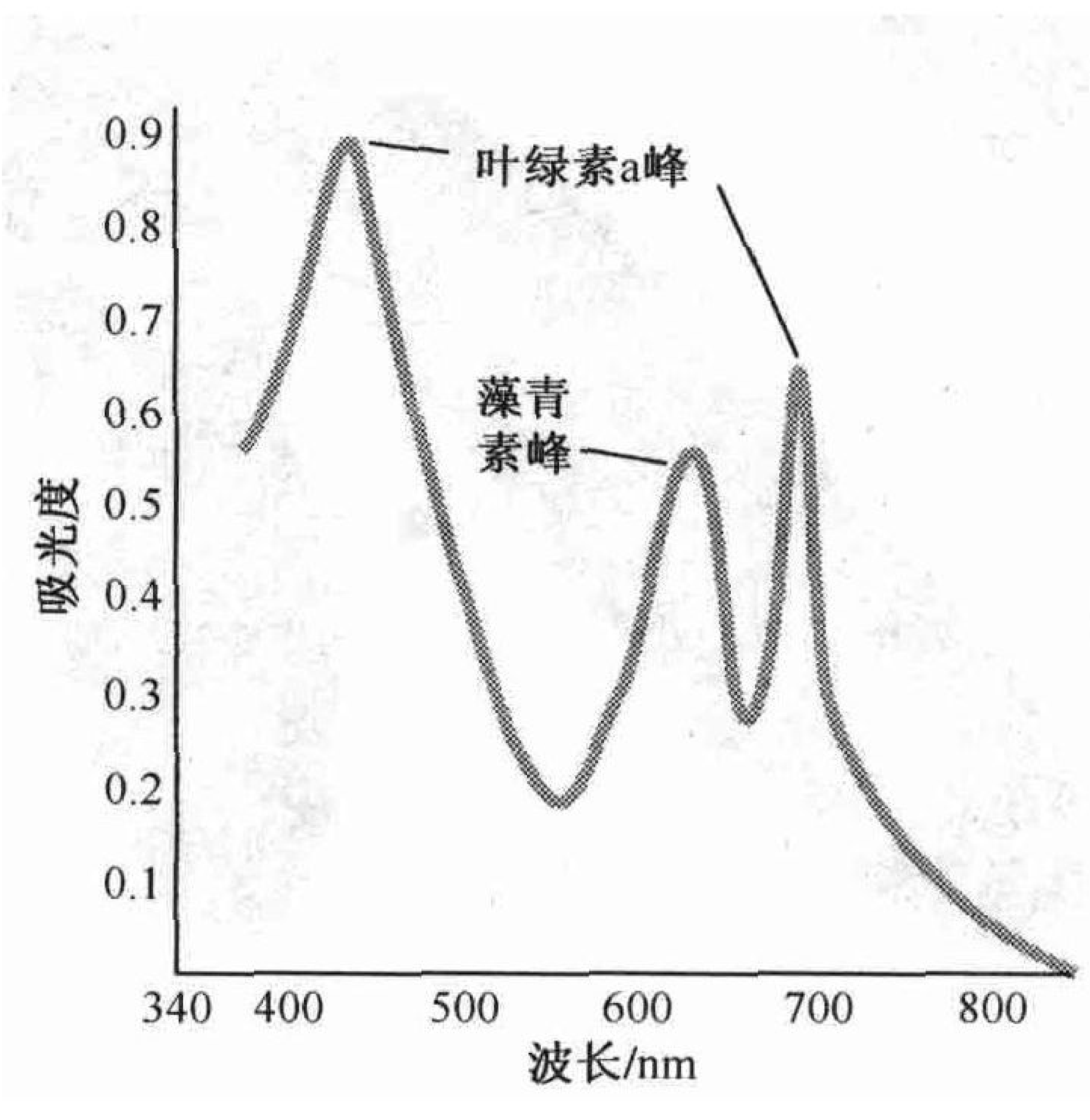


图 17.11 以藻胆蛋白（藻青素）作为一种辅助色素的蓝细菌的吸收光谱。注意藻青素的存在是如何扩大可利用光的波长范围（600～700nm）的。与图 17.3b 进行比较。

对生物体来说，像类胡萝卜素和藻胆蛋白这样的辅助色素的集光功能是非常有用的。太

阳光遍布整个可见光范围（图 10.6），而叶绿素仅可有效地吸收该光谱中的部分光，通过辅助色素生物体就能够捕获更多的可利用光（图 17.3 和图 17.11）。

概念检查

辅助色素如类胡萝卜素和藻胆素能够吸收光能并将光能传递给反应中心叶绿素，从而扩大光合作用中可用光的波长范围。类胡萝卜素还在防止细胞光氧化损伤方面起着重要的光保护作用。

- 藻胆蛋白是在哪种生物体中发现的？
- 与叶绿素相比，藻胆素的化学结构如何？与类胡萝卜素相比呢？
- 藻青素呈蓝绿色，它吸收什么波长的光（图 10.6）？

17.4 不生氧光合作用

在光养生物中，光介导生成 ATP 的过程包括通过一系列电子载体所进行的电子运输，这些电子载体在光合作用复合物中按还原电位（E_0'，见 5.6 节）从负电性到正电性的顺序依次排列，这样就允许从质子动力合成 ATP。

光合反应中心

紫色光养细菌的光合器包含在各种形态的胞质内膜系统中，膜泡囊（载色体）或膜片层是常见的膜类型（图 17.12）。紫色细菌的反应中心包含 3 种多肽，分别命名为 L、

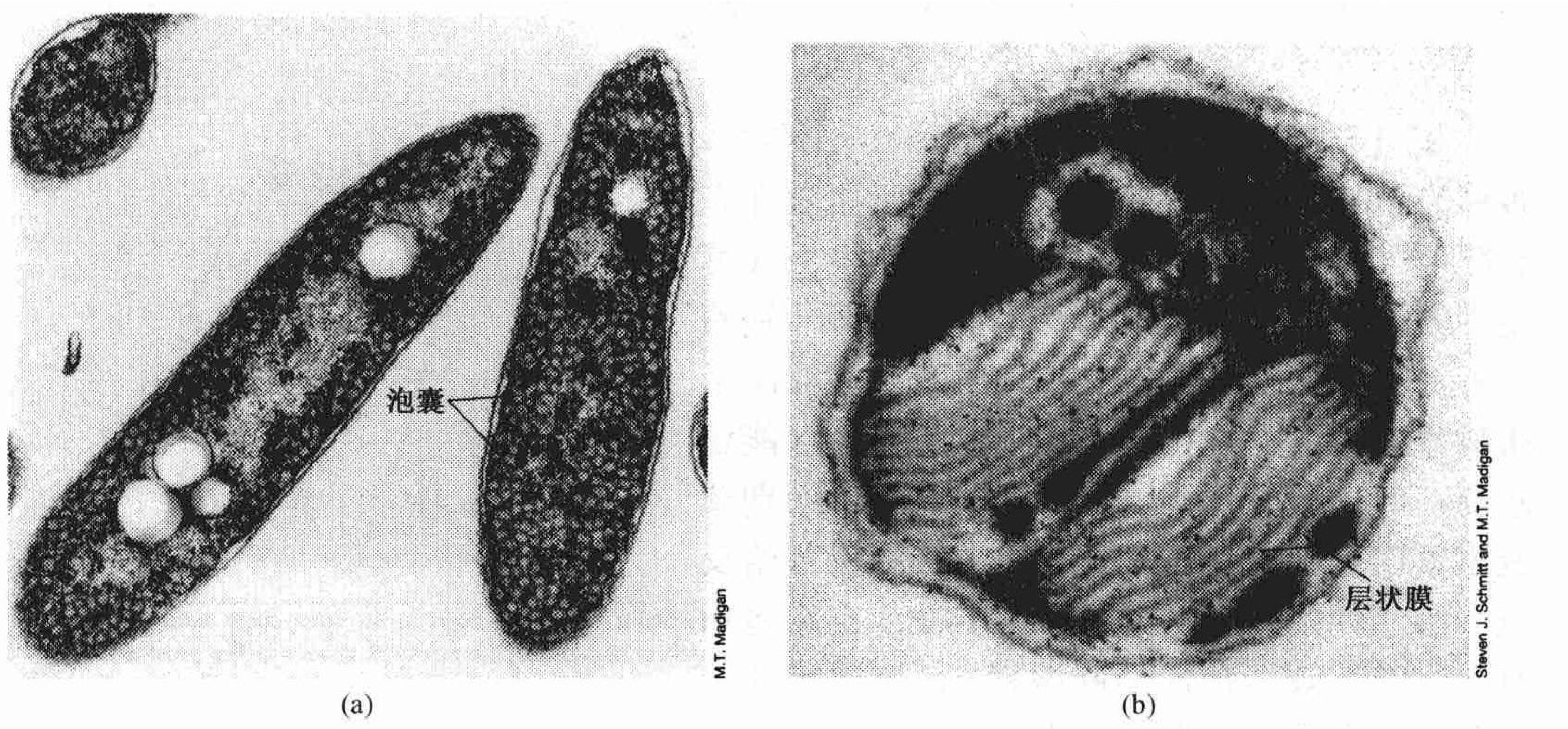


图 17.12 不产氧光养生物的膜类。（a）载色体。光养紫色细菌荚膜红细菌（*Rhodobacter capsulatus*）的细胞截面图，细胞内含有大量的囊状光合膜，这些泡囊是由细胞质膜内陷产生的，明亮的区域就是细胞内贮藏聚合物——聚 β-羟丁酸（见 4.13 节）储存的部位，细胞宽约 1μm。（b）嗜盐紫色细菌的层状膜。细胞宽约 1.5μm，这些膜也是由细胞质膜内陷产生的，但是并不形成泡囊，而是排列成膜堆积物，类似蓝细菌的类囊体（图 17.5）。

M和H亚基，这些蛋白质亚基深嵌在光合膜内并跨膜若干次（图17.13b）。L、M和H多肽与反应中心光化学复合物连接，后者包括被称为特殊配对的2个细菌叶绿素a分子、2个功能未知的其他的细菌叶绿素a分子、2个细菌脱镁叶绿素分子（细菌叶绿素a脱去1个镁原子）、2个醌分子以及2个类胡萝卜素色素分子（图17.13a）。反应中心的所有组分整合在一起，其整合方式可使它们能以极快的电子运输反应相互作用，最终导致ATP的产生。

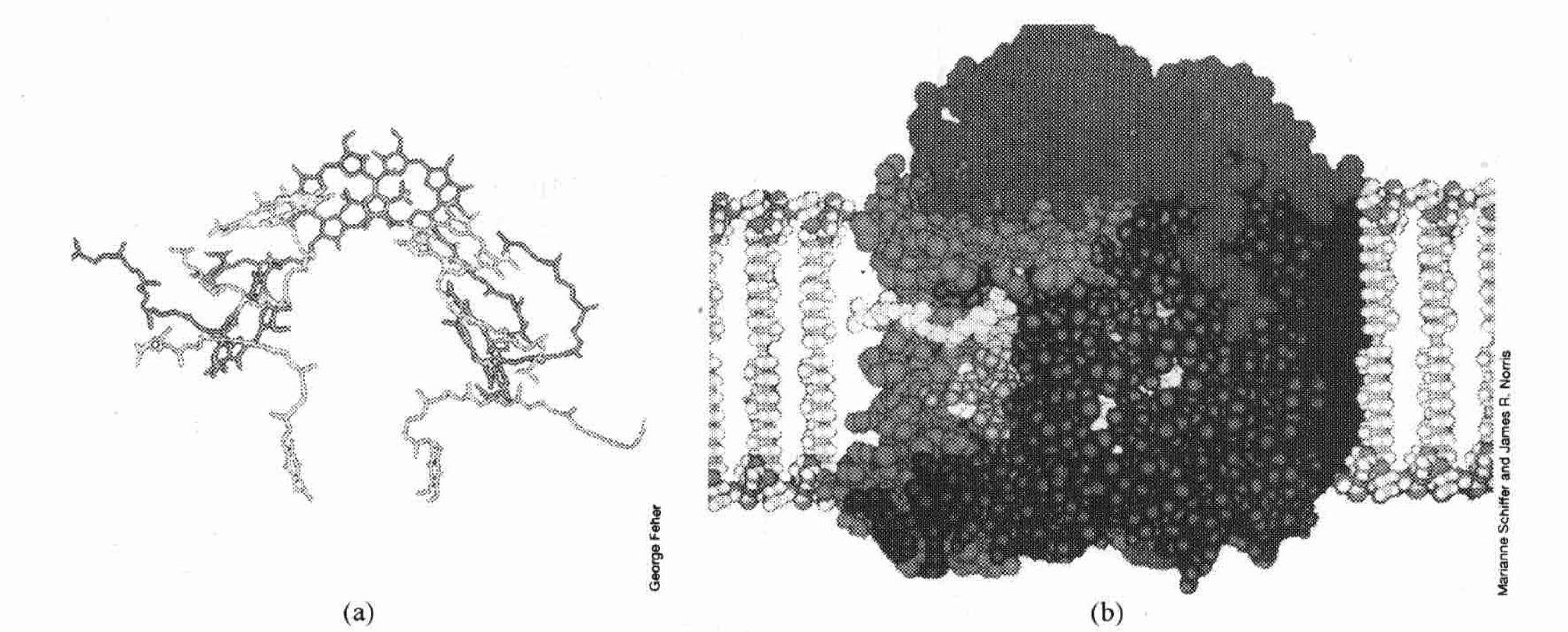


图17.13 紫色光养细菌反应中心的结构。（a）色素分子在反应中心的排列。图中以红色显示的是相互重叠的"特殊配对"细菌叶绿素分子，以暗黄色显示并指向下面的是醌分子，在"特殊配对"细菌叶绿素附近是辅助细菌叶绿素，以浅黄色显示，细菌脱镁叶绿素分子以蓝色显示。（b）反应中心蛋白质结构的分子模型。（a）中提及的色素被3种反应中心蛋白，即蛋白H（蓝色）、蛋白M（红色）和蛋白L（绿色）结合在膜上，反应中心色素-蛋白复合物嵌合在脂类双分子层膜中。

紫色细菌的光合作用电子流

先让我们来回忆一下，光合反应中心外面包围着集光天线细菌叶绿素a复合物，其功能是将光能聚集到反应中心（图17.6）。来自光子的光能一份一份地从天线色素转移给反应中心，这样的一份光能叫作激子，激子是可流动的能量，能够以极高的效率从天线色素迁移至反应中心。

当激子的能量撞击特殊配对细菌叶绿素a分子时，光合作用便开始了（图17.13a）。特殊配对细菌叶绿素a分子被所吸收的能量激发，转换成一个具有非常低的还原电位的强电子供体，一旦这个强电子供体产生后，光合作用电子流剩余步骤的作用就是保存电子从低E_0'的载体跨膜运输到高E_0'的载体时所释放的能量（图17.14）。

细菌的反应中心，被称为P870，激发前其E_0'约为+0.5V，激发后约为−1.0V（图17.14）。P870中被激发的电子继续还原反应中心中的1个细菌脱镁叶绿素a分子（图17.13a和图17.14），这种跃迁速度快得惊人，大约只需3×10^{-12}s。一旦被还原，细菌脱镁叶绿素a便开始还原膜中几个中间体醌分子，这种跃迁也非常快，不到10^{-9}s（图17.14和图17.15）。相对于反应中心所发生的反应来说，接下来的电子传递反应速度相当慢，约为几微秒到几毫秒。

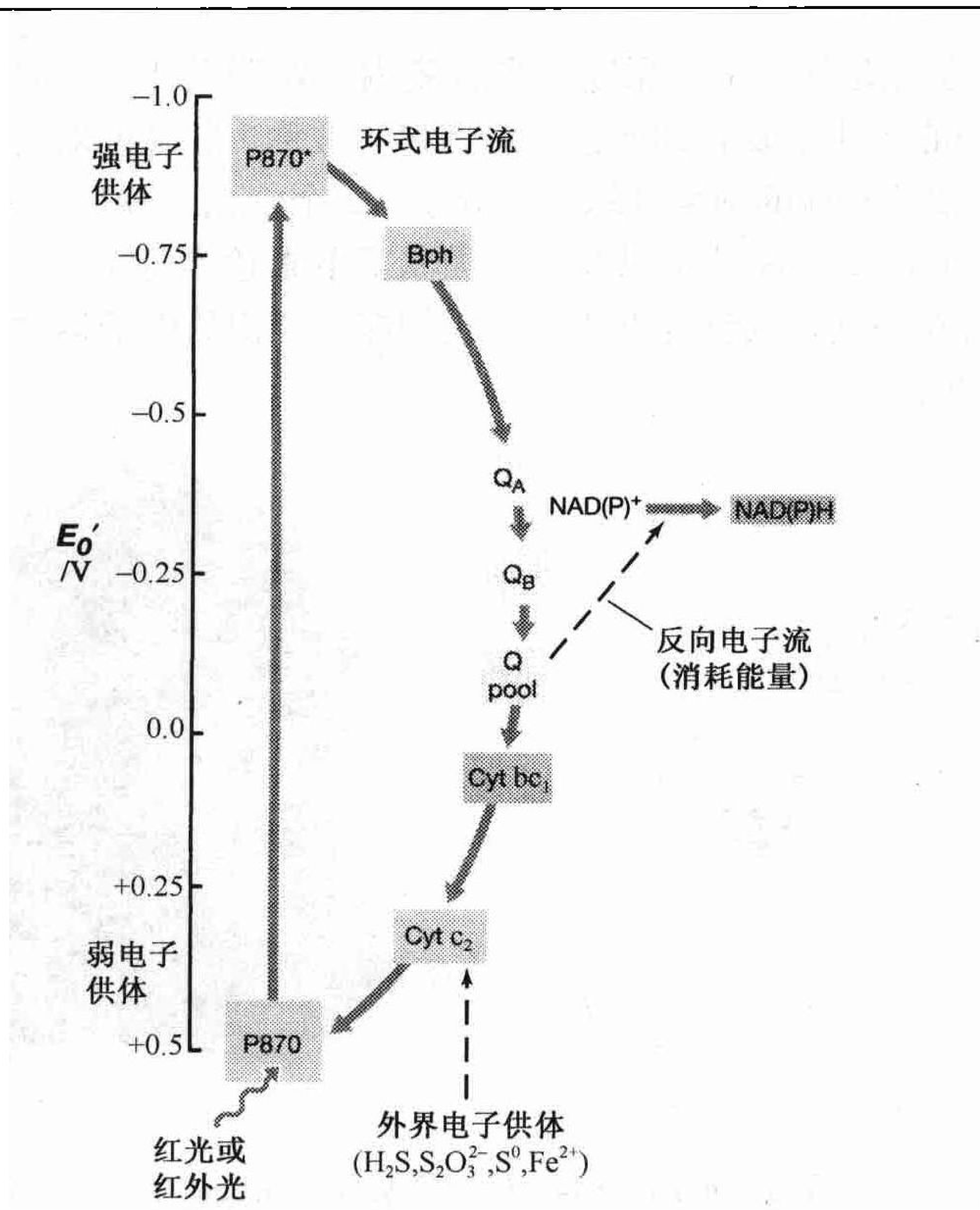


图 17.14　紫色细菌中不生氧光合作用电子流的总图解。只表示一个光反应过程，注意光能是如何将一个弱的电子供体 P870 转换成一个非常强的电子供体 P870* 的，随后，光合作用电子流的剩余步骤与呼吸作用电子流几乎相同（图 5.20）。Bph：细菌脱镁叶绿素；Q_A、Q_B：中间体醌；Q pool：膜内的醌池；Cyt：细胞色素。

从醌开始，电子在膜内通过一系列的铁硫蛋白和细胞色素进行传递（图 17.14 和图 17.15），最终又返回反应中心。关键的电子运输蛋白包括细胞色素 bc_1 和细胞色素 c_2（图 17.14）。细胞色素 c_2 是一种周质细胞色素，是膜结合 bc_1 复合物和反应中心之间的电子穿梭体（见 5.11 节、图 5.20、图 17.14 和图 17.15）。

光合磷酸化

在光合作用电子流动时，电子传递产生质子动力，并依赖 ATPase 的活性将消耗质子动力与形成 ATP 相偶联（见 5.12 节），开始合成 ATP。当细胞色素 c_2 给特殊配对细菌叶绿素（图 17.13）提供 1 个电子，使这些分子回到它们最初的基态电位（$E_0'=+0.5V$）时，便完成了这个系列反应。然后反应中心又能吸收新的能量重复该过程。

这种产生 ATP 的方法称为光合磷酸化（photophosphorylation），更确切地说，是环式光合磷酸化，因为电子是在一个封闭的回路中移动。与呼吸作用类似，在环式光合磷酸化中电子跨膜流动产生质子动力。然而与呼吸作用不同的是，在环式光合磷酸化中没有电子的净输入或消耗，电子仅是沿环路移动而已。

图 17.15 显示的是紫色细菌光合膜内电子传递组分的空间位置关系。注意：同呼吸

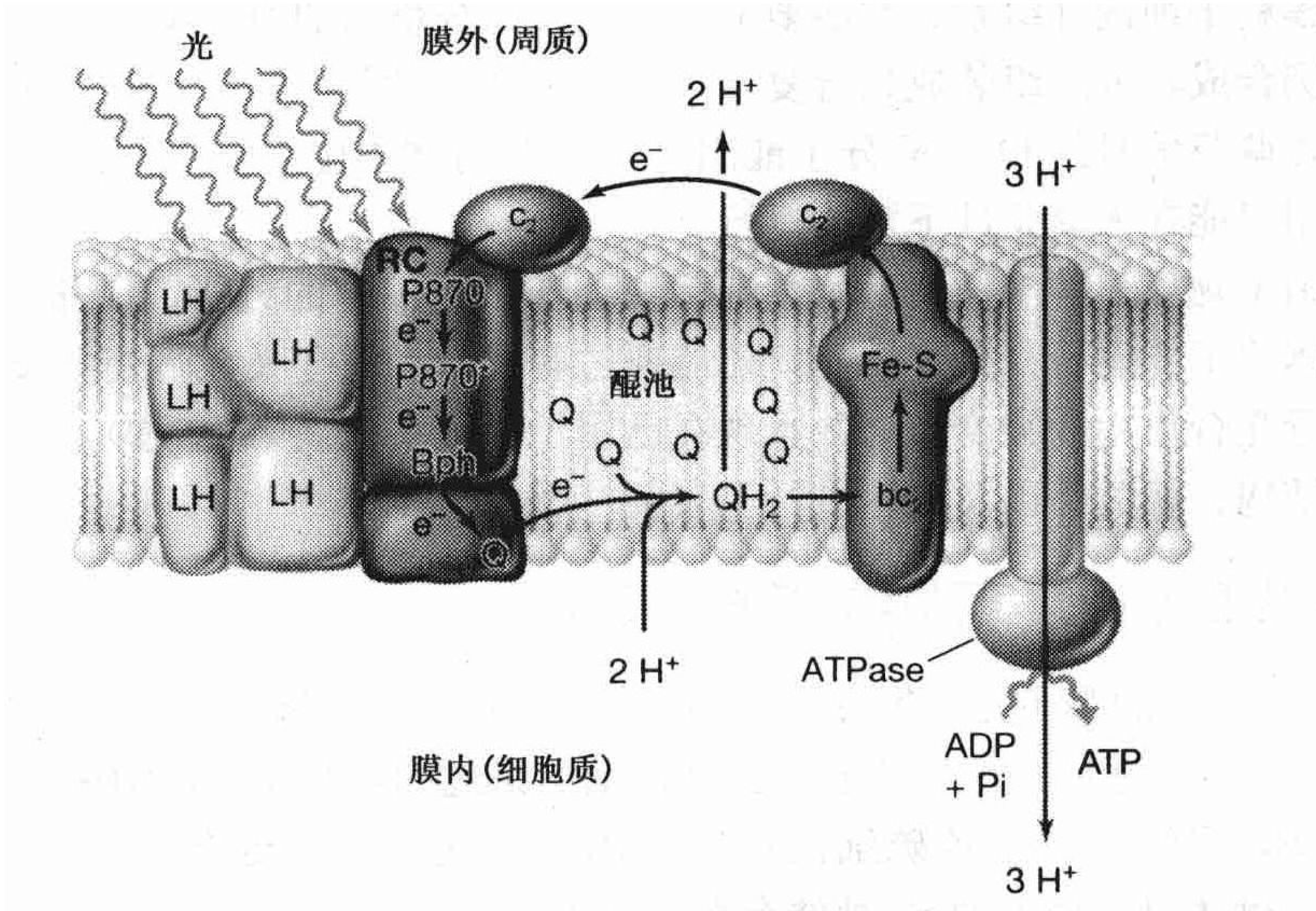


图 17.15 紫色光养细菌光合膜内蛋白质复合物的排列。光产生的质子梯度用于由 ATP 合酶(ATPase)催化合成 ATP。LH:集光细菌叶绿素复合物;RC:反应中心;Bph:细菌脱镁叶绿素;Q:醌;FeS:铁硫蛋白;bc_1:细胞色素 bc_1 复合物;c_2:细胞色素 c_2。有关细胞色素 bc_1 复合物和醌循环的功能,此处未显示,详见图 5.20,有关 ATPase 功能的描述见图 5.21。

作用电子流(见 5.11 节)一样,在光合作用电子传递时,细胞色素 bc_1 复合物和醌池相互作用(图 5.20)是建立质子动力以驱动 ATP 合成的主要途径(图 17.15)。

细菌光合作用的遗传学

紫色光养细菌是革兰氏阴性原核生物(见 12.2 节),有些种易于进行基因操作。红细菌属的种,尤其是荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)和类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*),已经成为细菌光合作用遗传学研究的主要材料,这两种紫色非硫细菌的基因组已被测序(见 12.2 节)。在红细菌中,与光合作用有关的大多数基因都簇集在几个操纵子中,在染色体上跨度约 50kb,被称为光合作用基因簇(photosynthetic gene cluster)(图 17.16)。光合作用基因簇中的基因编码多种蛋白质:①细菌叶绿素生物合成(*bch* 基因);②类胡萝卜素生物合成(*crt* 基因);③在反应中心结合色素的多肽以及集光色素复合物(*puf* 和 *puh* 基因)(图 17.16)。

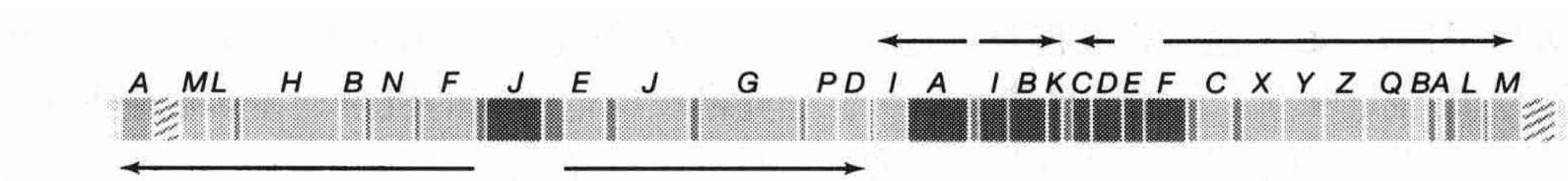


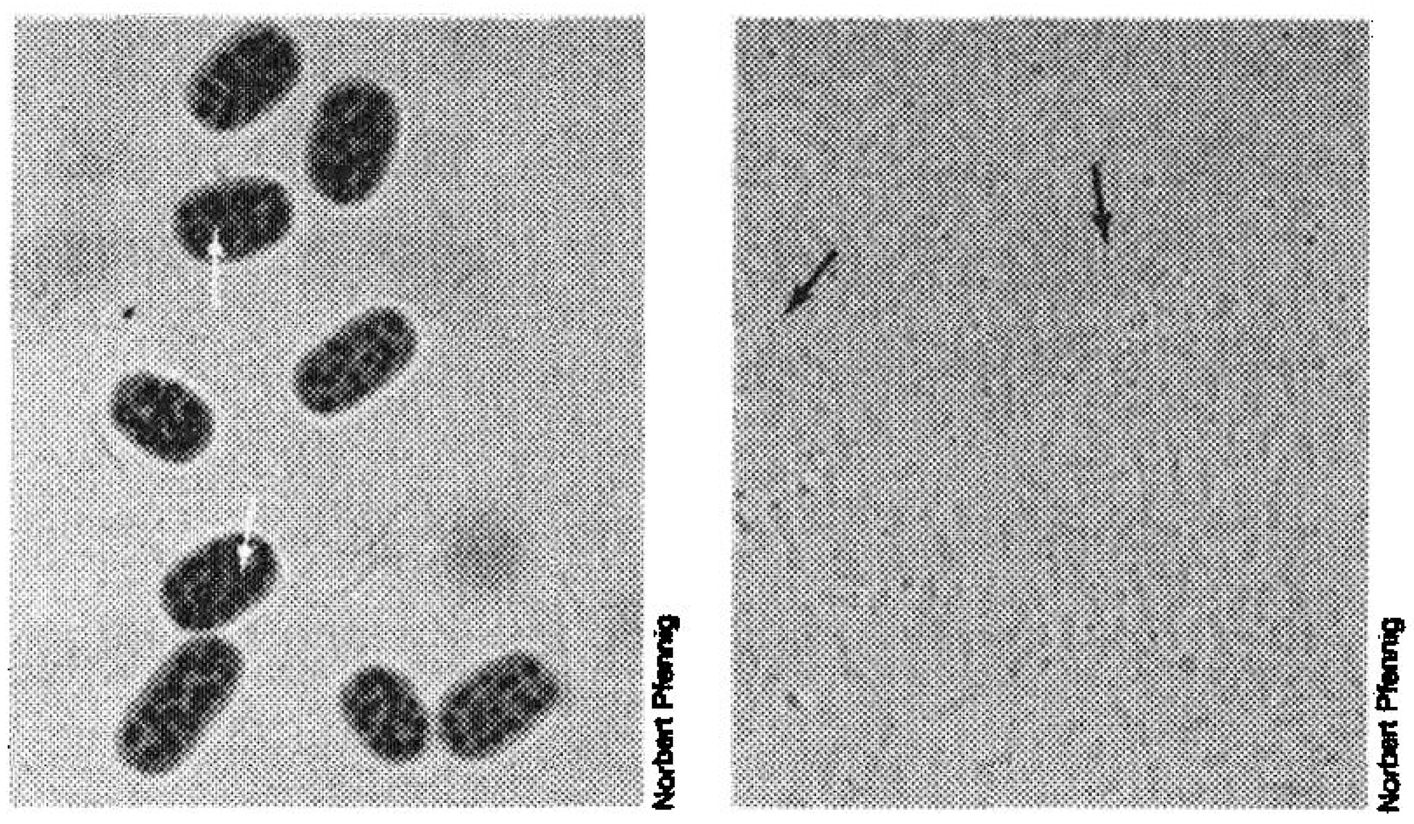
图 17.16 紫色光养细菌荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)的光合作用基因簇图。编码细菌叶绿素合成蛋白的 *bch* 基因用绿色表示,编码合成类胡萝卜素的蛋白的 *crt* 基因用红色表示,编码反应中心多肽的 *puh* 和 *puf* 基因用蓝色表示,编码集光色素 Ⅰ 多肽(B870 复合物)的 *puf* 基因用黄色表示,用斜线表示的基因其功能未知,箭头表示转录方向。

基因簇利于细菌叶绿素、类胡萝卜素和色素结合蛋白的协同编码，以保证各组分以正确的比例合成，最终组装成光合复合物。在不产氧光养生物中，控制光合作用基因簇转录的主要调节信号是 O_2。氧分子能阻遏这些生物体中色素分子的生物合成，这样使得光合作用只能在无氧条件下才能进行。

红细菌生物能学的多样性对紫色细菌光合作用遗传学的分析起了很大的辅助作用。这些生物体除了能进行光合作用外，还能通过有氧或无氧呼吸在暗处生长，因此易于获得不能进行光合作用的突变株，并且现在已用于遗传实验（第 10 章），对光合作用基因的数量、结构、相关性以及表达进行了表征（图 17.16）。

紫色细菌的自养：电子供体和反向电子流

对自养生长的紫色细菌来说，只形成 ATP 是不够的，还必须产生还原力（NADH）将 CO_2 还原成细胞物质。正如以前所讲过的，对紫色硫细菌来说，还原力通常来自 H_2S，尽管许多紫色硫细菌可以利用 S^0、$S_2O_3^{2-}$ 甚至 Fe^{2+}。当紫色硫细菌以 H_2S 为电子供体时，球形的 S^0 被储存在细胞内（图 17.17a）。



(a)　　(b)

图 17.17　用明视野显微镜拍摄下来的光养硫细菌的显微照片。（a）紫色细菌：奥氏着色菌（*Chromatium okenii*），注意硫粒沉积在细胞内（箭头）。（b）绿色细菌：泥生绿菌（*Chlorobium limicola*），折射体就是沉积在细胞外的硫粒（箭头）。硫粒均来自于 H_2S 的氧化，以获得还原力。奥氏着色菌细胞直径约 5μm，泥生绿菌细胞直径约 0.9μm。

还原性物质如 H_2S 被 c 型细胞色素氧化，产生的电子最终终止于光合膜的“醌池”（图 17.14）。然而醌的电位 E'_0（约 0V）不足够低，不能直接还原 NAD^+（E'_0＝－0.32V），因此必须迫使来自醌池的电子逆热力学梯度移动，以便将 NAD^+ 还原成 NADH（图 17.14）。这种需要能量的过程称为反向电子流（reverse electron flow），由质子动力的能量驱动。化能无机营养生物也是凭借反向电子流的机制，在多数情况下，利用非常高 E'_0 的电子供体产生还原力（见 17.8～17.12 节）。

其他不产氧光养生物的光合作用

到目前为止，我们有关光合电子流的讨论集中在紫色细菌上，尽管其他不产氧光养生物依靠类似的膜组分驱动光合磷酸化，但是在影响还原力生物合成的某些光化学反应上存在着不同。

图 17.18 比较了紫色细菌、绿色细菌和阳光杆菌的光合电子流。注意，后两者反应中心细菌叶绿素激发态的电位 E_0' 明显低于紫色细菌的，并且在反应中心存在的就是叶绿素 a（绿色细菌）或者一种结构上被修饰的叶绿素 a（称为羟基叶绿素 a）（阳光杆菌）。紫色细菌的第一个稳定的受体分子（醌）的 E_0' 约 0V，与紫色细菌不同，绿色细菌和阳光杆菌的受体（FeS 蛋白）的 E_0' 负电性高于 NADH。在绿色细菌中，一种被称为铁氧还蛋白（FeS 蛋白还原而来，图 17.18）的蛋白质是反向柠檬酸循环（图 17.24a）中 CO_2 固定反应的直接电子供体。因此，与产氧光养生物一样（将在下面讨论），绿色细菌和阳光杆菌中 ATP 和还原力均是光反应的直接产物。当绿色细菌以硫化物为电子供体合成还原力时，像紫色细菌一样产生球形的 S^0，但是硫粒仍在细胞外，而不是在细胞内（图 17.17b）。

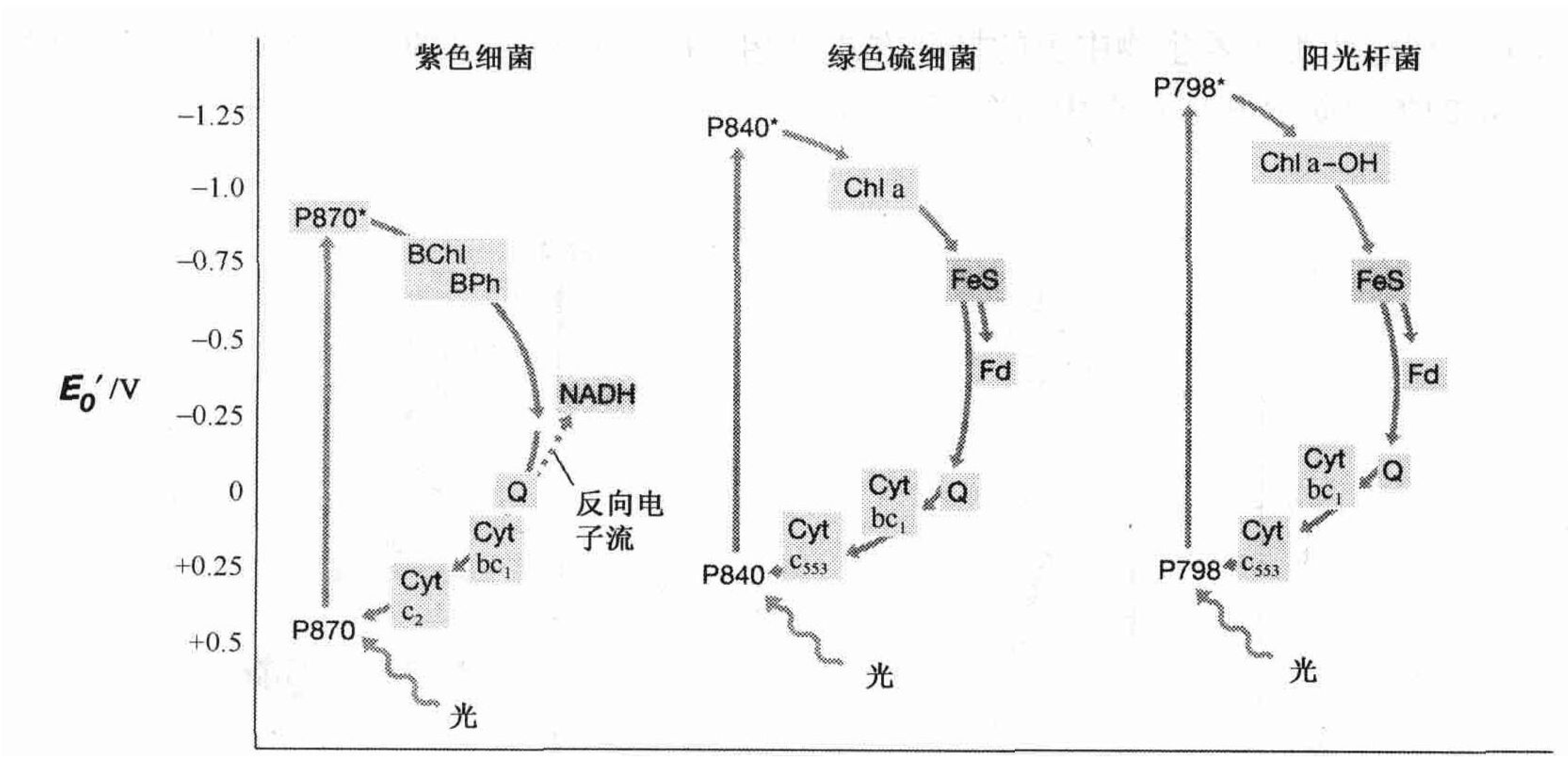


图 17.18　紫色细菌、绿色硫细菌和阳光杆菌光合电子流的比较。注意：紫色细菌主要电子受体（醌，Q）的电位的正电性高于 NAD^+/NADH 这一事实是如何使反向电子流成为必需的。绿色细菌和阳光杆菌的铁氧还蛋白（Fd），其 E_0' 的负电性高于 NADH，靠光驱动的反应产生。在绿色细菌中，铁氧还蛋白驱动自养作用的羧化反应（图 17.24a）。Bchl：细菌叶绿素；BPh：细菌脱镁叶绿素。P870 和 P840 分别是紫色细菌和绿色细菌的反应中心，含有 Bchl a。阳光杆菌的反应中心（P798）含有 Bchl g。绿屈挠菌（*Chloroflexus*）的反应中心与紫色细菌相类似。注意绿色细菌和阳光杆菌反应中心叶绿素 a 的存在形式。

概念检查

不产氧光养生物的光合反应中心发生一系列电子传递反应，最终产生质子动力、合成 ATP。用于 CO_2 固定的还原力来自于环境中存在的还原剂，并且在紫色光养生物中需要利用反向电子运输。

◆ 与呼吸作用的电子传递磷酸化相比，光合磷酸化是怎样进行的？

◆ 什么是反向电子流？为什么它是必需的？哪种光养生物需要利用反向电子流？

17.5 生氧光合作用

与不产氧光养生物相比，产氧光养生物中电子流包括两个截然不同但相互联系的光化学反应。产氧光养生物利用光能产生 ATP 和 NADPH，用于产生 NADPH 的电子来源于水分解成氧和电子的反应（图 17.2）。光反应的两个系统分别叫做光系统Ⅰ（photosystem Ⅰ）和光系统Ⅱ，每个光系统都有一个光谱性质不同的反应中心叶绿素 a。光系统Ⅰ的叶绿素称为 P700，吸收波长较长的光（远红光），而光系统Ⅱ的叶绿素称为 P680，吸收波长较短的光（近红光）。

与不生氧光合作用一样，生氧光合作用的光化学反应也发生在膜内。在真核细胞内这些膜位于叶绿体中（图 17.5），然而在蓝细菌中，光合膜堆积排列在胞质中（图 17.6）。在这两类光养生物中膜的排列方式是相似的，两种类型的叶绿素 a 都结合在膜内特定的蛋白质上并相互作用（图 17.19）。

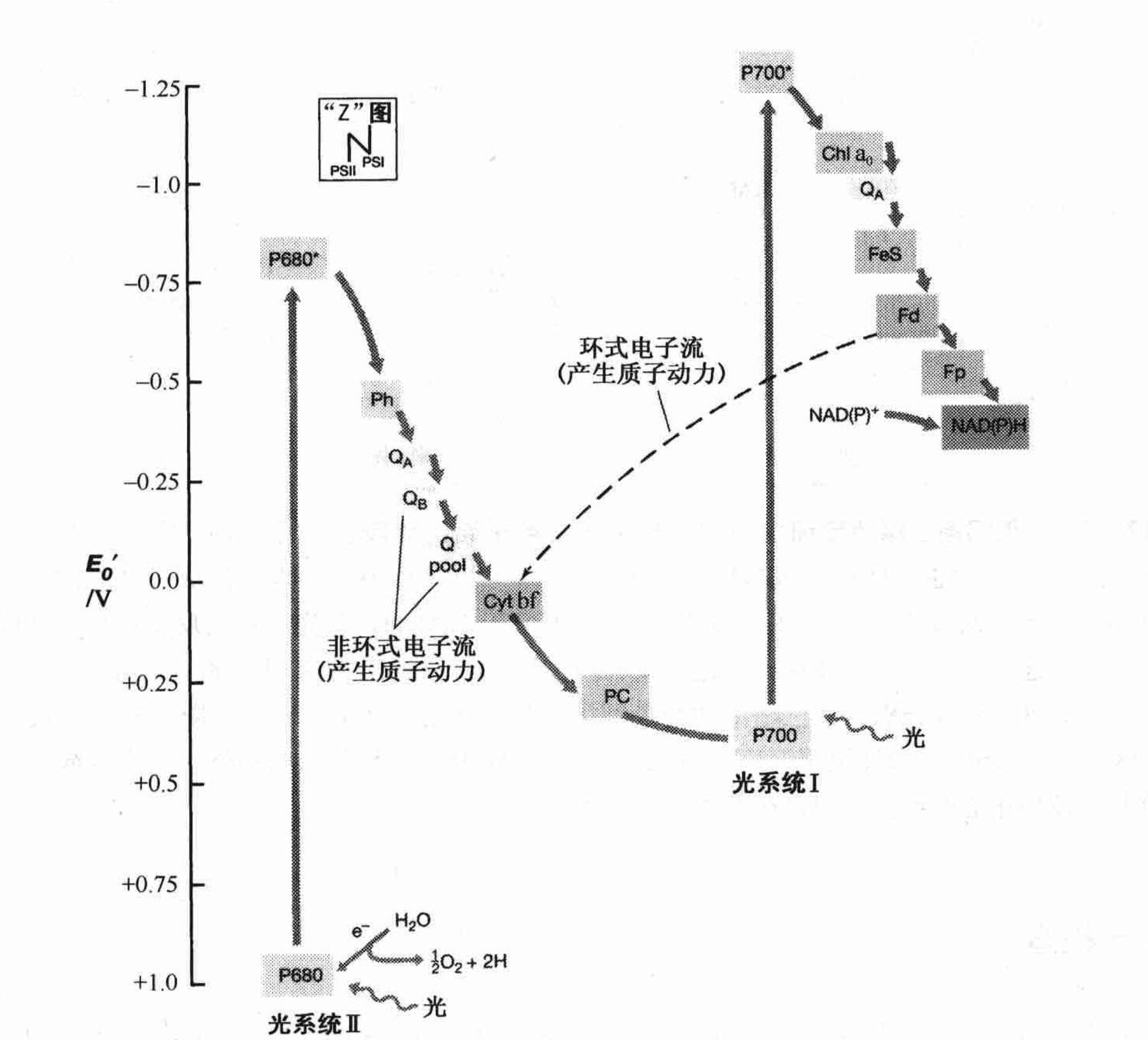


图 17.19 产氧（绿色植物）光合作用的电子流，“Z”图。涉及两个光系统（PS）：PSⅠ和PSⅡ。Ph：脱镁叶绿素；Q：醌；Chl：叶绿素 a；Cyt：细胞色素；PC：质体蓝素；FeS：非血红素铁硫蛋白；Fd：铁氧还蛋白；Fp：黄素蛋白；P680 和 P700 分别是 PSⅡ和 PSⅠ的反应中心叶绿素。与图 17.14 进行比较。

生氧光合作用中的电子流

生氧光养生物中电子流的路径类似字母Z，图17.19绘出了“Z”图的轮廓。光系统Ⅱ中叶绿素a分子P680的还原电位呈强正电性，其正电性甚至高于O_2/H_2O，这样可促进产氧电子流第一步的进行，即水分解成氧和氢原子（图17.19），这是个热力学上不宜进行的反应。680nm附近的1个光量子被吸收后，从水中分解出的1个电子便给了处于氧化状态的P680分子。光能将P680转化成一个中等强度的还原剂，使它能还原一个E_0'约为-0.5V的分子。这个分子的种类尚未确定，但可能是脱镁叶绿素a分子（叶绿素a去掉它的镁原子）。

此后电子通过几个膜载体进行传递，包括醌、细胞色素以及一个被称作质体蓝素（plastocyanin）的含铜蛋白质，后者将电子提供给光系统Ⅰ。光系统Ⅰ的反应中心叶绿素P700预先吸收了光量子，当接受电子后，便开始进行一系列反应导致$NADP^+$的还原（图17.18），包括电子通过几个E_0'逐渐正向升高的载体进行传递，最终随着$NADP^+$的还原，电子传递终止（图17.19）。

生氧光合作用中ATP的合成

除了净合成还原力（即NADPH）以外，当电子在膜内从一个光系统传递给另一个光系统时还发生了其他一些重要的反应。在电子从光系统Ⅱ中的受体转移至光系统Ⅰ的反应中心叶绿素分子时，电子是沿着热力学上利于进行的方向进行传递（从低电位到高电位），这样就产生了一个质子动力进而能够合成ATP。由于电子并不循环回去还原被氧化的P680，而是用于还原$NADP^+$，所以这种产生ATP的方式称为非环式光合磷酸化。

当存在足够的还原力时，产氧光养生物通过只涉及光系统Ⅰ的环式光合磷酸化过程也能够产生ATP（图17.18）。当电子从铁氧还蛋白迁移到细胞色素bf复合物，细胞色素bf复合物再将电子返回给P700时，就可以发生环式光合磷酸化，这个电子传递过程产生一个膜电势并合成额外的ATP（图17.19中的虚线所示）。

产氧光养生物中的不生氧光合作用

在生氧光合作用中光系统Ⅰ和光系统Ⅱ通常一起发挥作用，然而，在某些条件下一些藻类和蓝细菌可以只利用光系统Ⅰ来进行环式光合磷酸化，从水之外的物质中获得还原力来还原CO_2。实际上，这是不生氧光合作用（anoxygenic photosynthesis）。

许多蓝细菌能够利用H_2S作为不生氧光合作用的电子供体，而绿藻利用H_2。当H_2S被利用时，它被氧化成单质硫（S^0），产生与绿色硫细菌（图17.17b）相似的硫粒，沉积在细胞外。图17.20即以蓝细菌沼泽颤蓝细菌（*Oscillatoria limnetica*）作为这方面的一个例子。沼泽颤蓝细菌是一种丝状蓝细菌，生活在富含硫化物的盐池中，在那里它和光合绿色细菌和光合紫色细菌一起进行不生氧光合作用，产生硫化物的氧化产物硫（图17.20）。在沼泽颤蓝细菌的培养物中，光系统Ⅱ的电子流被H_2S强烈抑制，因此如果生物体想存活下去的话，需要进行不生氧光合作用。

从进化的观点来看，产氧和不产氧光养生物中均存在环式光合磷酸化，这也表明两

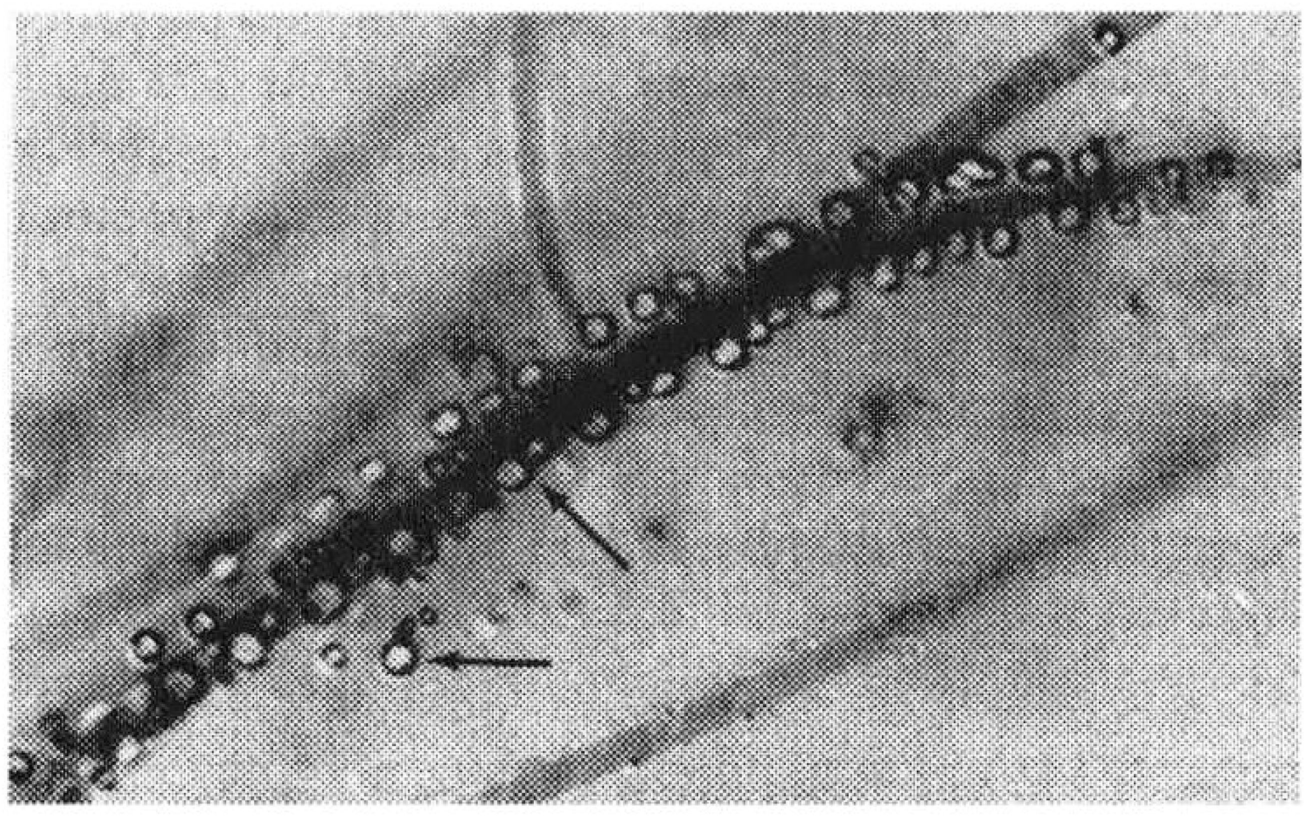


图 17.20 以硫化物为光合作用电子供体进行厌氧生长的丝状蓝细菌沼泽颤蓝细菌（*Oscillatoria limnetica*）的细胞。注意硫化物的氧化产物——球形的硫粒（箭头所示）形成在细胞外。

者之间存在密切关系。产氧光养生物，如沼泽颤蓝细菌，获得了光系统Ⅱ，因此能够分解水，但它们仍保留着在某些条件下仅使用光系统Ⅰ的能力，此时就如同不产氧光养生物在光养生长时一样。

概念检查

在生氧光合作用中，水提供电子，驱动自养，并产生氧气作为副产物。两个独立的光反应系统即光系统Ⅰ和光系统Ⅱ与此相关。光系统Ⅰ与不生氧光合作用中的反应系统类似，光系统Ⅱ负责将水分解产生 O_2。

◆ 关于生氧光合作用，为什么使用非环式电子流这个术语？

◆ 光系统Ⅰ和光系统Ⅱ反应中心叶绿素分子在吸光性及 E_0' 上的主要区别是什么？

17.6 自养生物 CO_2 的固定：卡尔文循环

几个有关固定 CO_2 生成细胞物质以支持自养生长的生化机制已为人们所熟知，其中获得广泛认可的是以它的发现者 Melvin Calvin 命名的卡尔文循环（Calvin cycle）。卡尔文循环需要 NAD(P)H 和 ATP 以及 2 个关键酶——二磷酸核酮糖羧化酶（ribulose bisphosphate carboxylase）和磷酸核酮糖激酶（phosphoribulokinase），循环中其他的酶反应由存在于许多自养和异养生物中的一系列酶所催化。

RubisCO 和 PGA 的形成

卡尔文循环中 CO_2 还原的第一步反应由二磷酸核酮糖羧化酶（简写成 RubisCO）所催化，RubisCO 广泛分布于自然界中，在紫色细菌、蓝细菌、藻类、绿色植物、多数化能无机营养细菌，甚至一些嗜盐和嗜高温的古生菌中均有该酶存在。RubisCO 催化二磷酸核酮糖和 CO_2 反应，形成 2 分子的 3-磷酸甘油酸（3-phosphoglyceric acid, PGA），见图 17.21，然后 PGA 被磷酸化，并被还原成糖酵解中的一个关键中间体——3-磷酸甘油醛（glyceraldehyde 3-phosphate）（见 5.10 节），从 3-磷酸甘油醛开始，通

过糖酵解早期步骤的逆反应即可生成葡萄糖（图 5.14）。

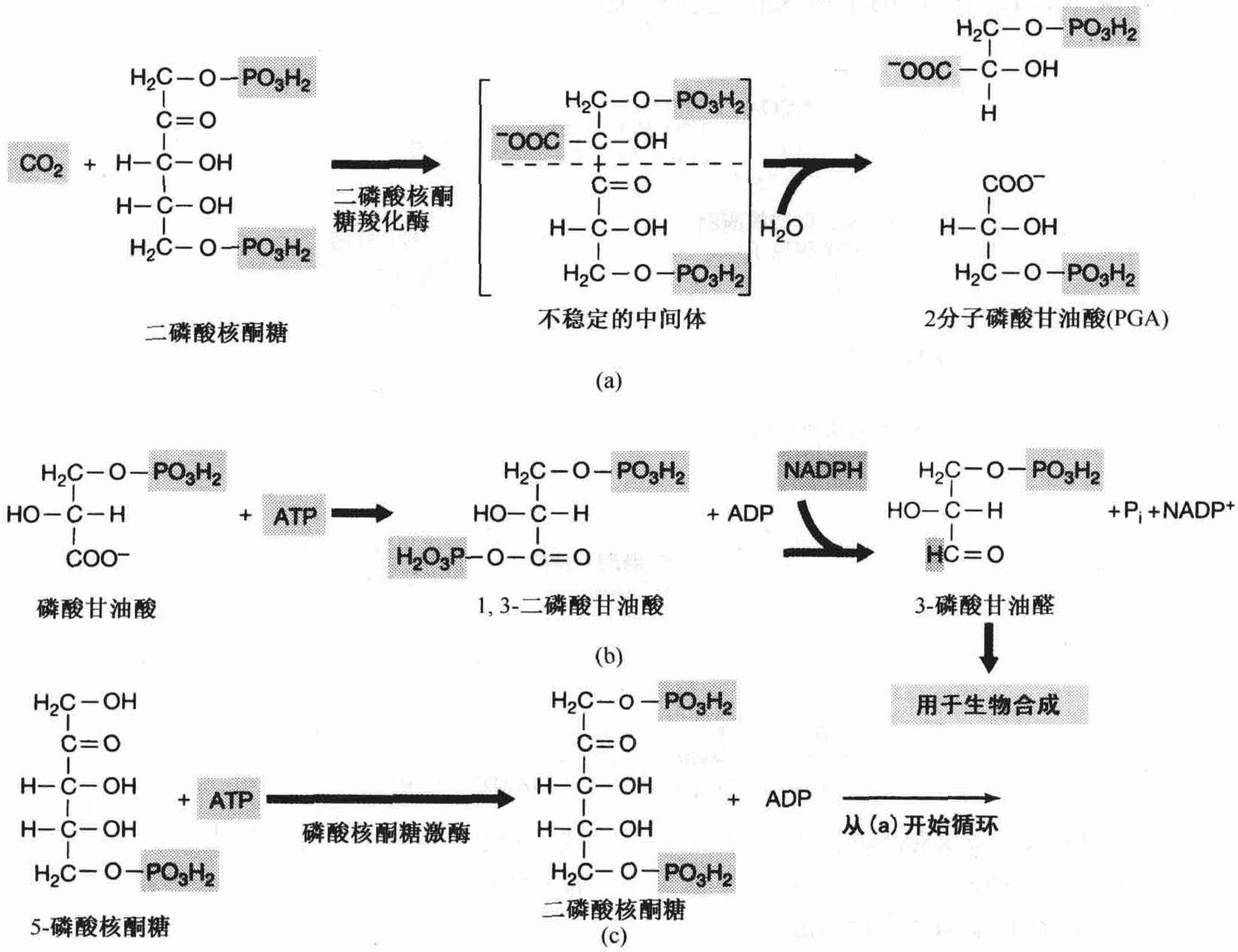


图 17.21　卡尔文循环的关键酶促反应。（a）二磷酸核酮糖羧化酶催化的反应。（b）3-磷酸甘油酸（PGA）转化成 3-磷酸甘油醛的反应，注意既需要 ATP 又需要 NADPH。（c）5-磷酸核酮糖在磷酸核酮糖激酶的作用下转化成 CO_2 的受体分子二磷酸核酮糖。

卡尔文循环的化学计算

为了方便起见，假设有 6 个分子的 CO_2 一起参与卡尔文循环，因为生成 1 个葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$）分子需 6 个 CO_2 分子。由于 RubisCO 要和 6 个 CO_2 分子结合，所以必须有 6 个二磷酸核酮糖分子作为受体分子（图 17.22），这样将产生 12 个 3-磷酸甘油酸分子（共有 36 个碳原子），这 12 个分子作为碳骨架重新形成 6 个二磷酸核酮糖分子（共有 30 个碳原子）和 1 个己糖分子（6 个碳原子）用于细胞合成。一系列复杂的分子重排反应产生 C_3、C_4、C_5、C_6 和 C_7 等中间体，最后产生 6 个 5-磷酸核酮糖，由 6 个 5-磷酸核酮糖生成 6 个二磷酸核酮糖。二磷酸核酮糖再生过程中的最后一步反应是在磷酸核酮糖激酶（phosphoribulokinase）的作用下消耗 ATP 使 5-磷酸核酮糖磷酸化（图 17.21c），磷酸核酮糖激酶与 RubisCO 一样，也是卡尔文循环中的特征酶。

从总体上来对卡尔文循环进行化学计量（图 17.22），将 12 个磷酸甘油酸（PGA）分子还原成 3-磷酸甘油醛需要 12 个 ATP 分子和 12 个 NADPH 分子，磷酸核酮糖转化成二磷酸核酮糖又需消耗 6 个 ATP，所以 6 个 CO_2 通过卡尔文循环生成 1 个己糖共需

12 个 NADPH 和 18 个 ATP。己糖分子可以转化成贮藏性多聚物，如糖元、淀粉或聚β-羟基烷酸（4.11 节），用于将来构建新的细胞物质。

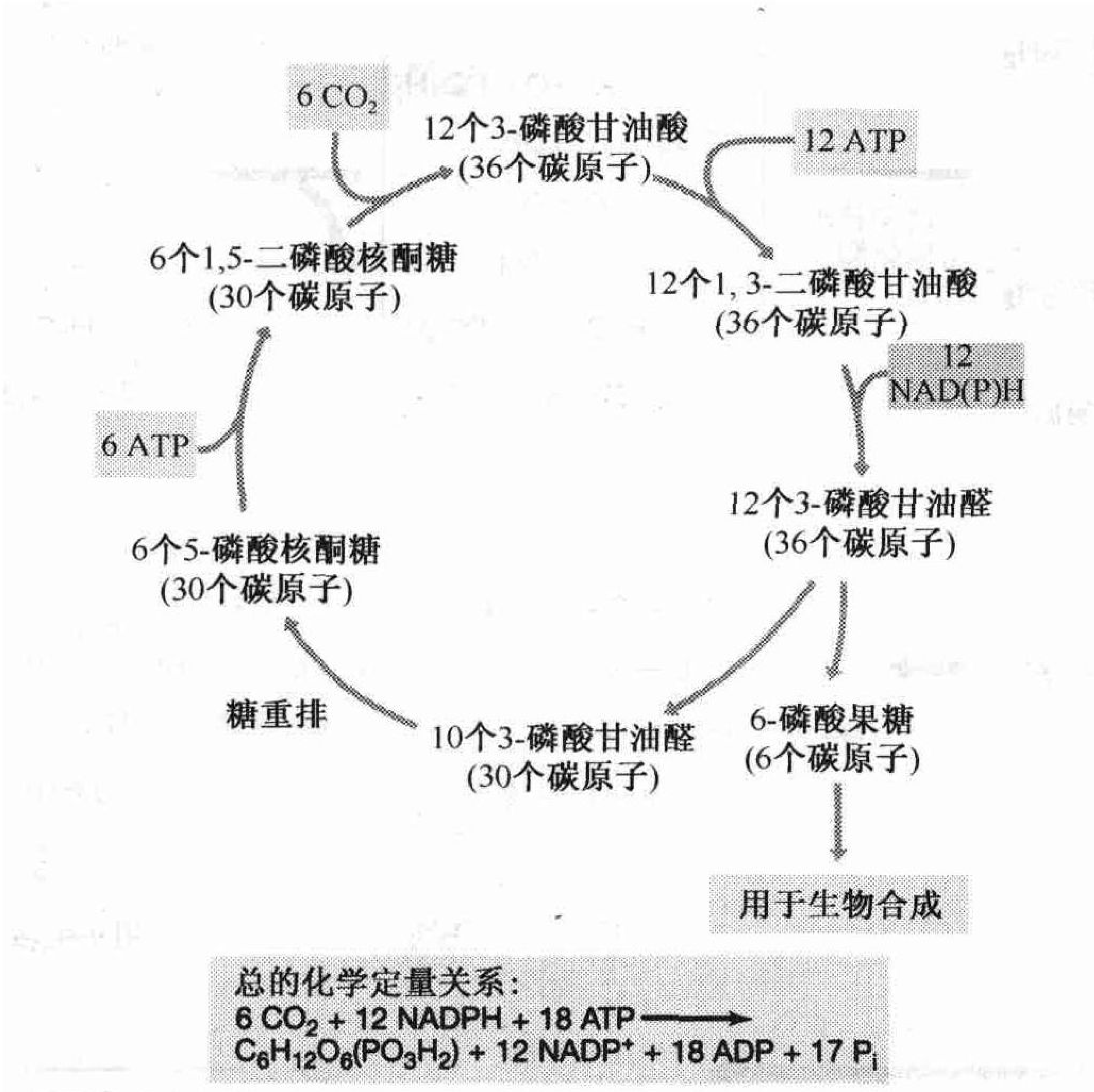


图 17.22 卡尔文循环。显示的是从 CO_2 生成 1 个己糖分子的过程。每结合 6 个 CO_2 分子便产生 1 分子 6-磷酸果糖。在光养生物中，ATP 来源于光合磷酸化，NAD(P)H 来自光或反向电子流。

羧酶体

有几种利用卡尔文循环固定 CO_2 的自养原核生物产生多面体形细胞包含体，称为羧酶体（carboxysome）。这些包含体的直径约 100nm，被一层薄的非单位膜包裹，由紧密包装的结晶状排列的 RubisCO 分子组成（图 17.23 和图 12.10a）。羧酶体的形成被认为是一种策略，可以在不影响细胞质的摩尔渗透压浓度的情况下（因为羧酶体为不溶性，不会影响渗透压），提高细胞中 RubisCO 的含量，从而以更快的速度固定 CO_2。

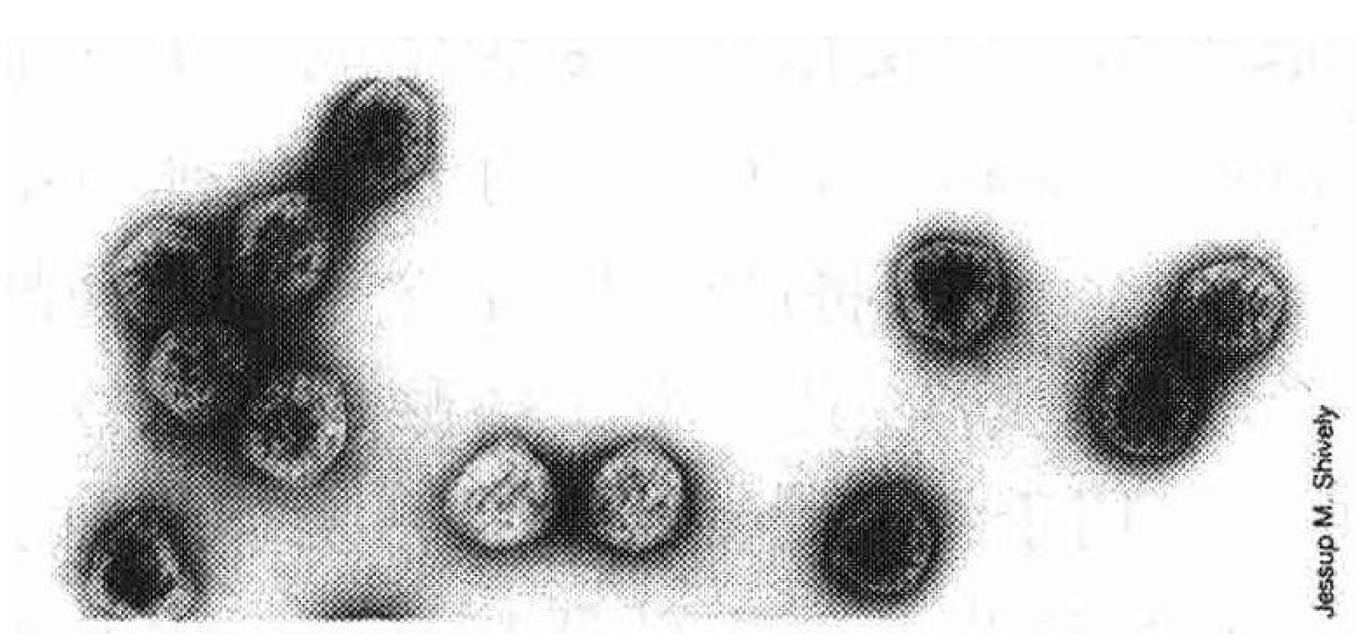


图 17.23 结晶状的卡尔文循环酶：羧酶体。化能无机营养的硫氧化菌——那不勒斯硫杆菌（*Thiobacillus neapolitanus*）纯化的羧酶体的电子显微照片。羧酶体的直径约 100nm，存在于多种专性自养原核生物中。

羧酶体存在于专性化能无机营养的氧化硫细菌、硝化细菌、蓝细菌和原绿藻中（分别见 12.3 节、12.4 节、12.26 节和 12.27 节），在兼性自养生物（既可自养生长又可异养生长的生物）（如紫色不产氧光养生物）中未发现羧酶体。因此，羧酶体的存在似乎是为了适应在严格自养条件下的生存。

概念检查

多数光养生物和一些自养生物通过卡尔文循环来固定 CO_2，卡尔文循环中二磷酸核酮糖羧化酶（RubisCO）起着关键作用。卡尔文循环是一个需能过程，通过该过程将 CO_2 转化成糖。

◆ 二磷酸核酮糖羧化酶催化的是什么反应？

◆ 为什么自养生长需要还原力？

◆ 什么是羧酶体？

17.7 自养生物 CO_2 的固定：反向柠檬酸循环和羟丙酸循环

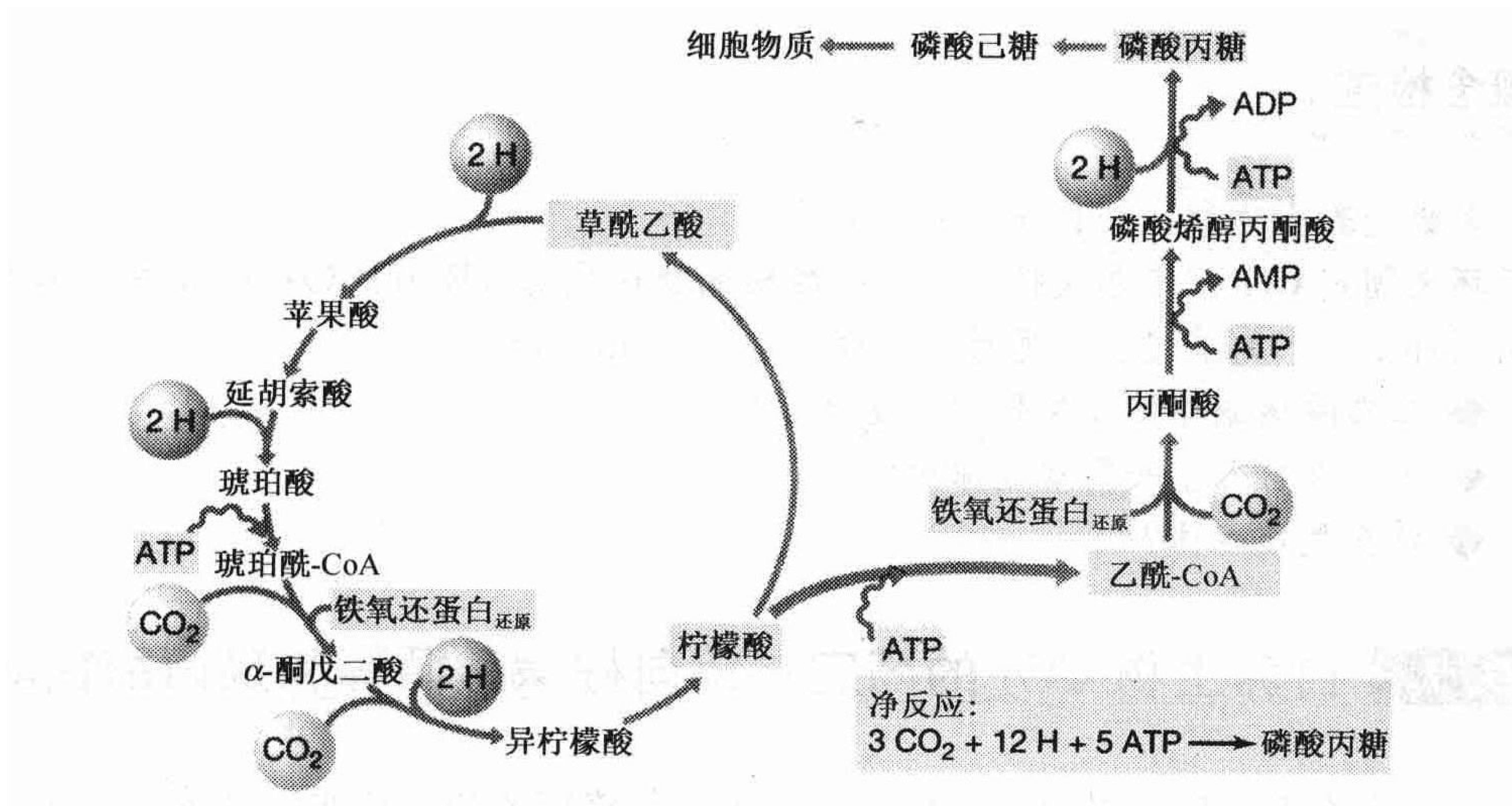
自养生物固定 CO_2 的另一个机制存在于绿色硫细菌和绿色非硫细菌中。在绿色硫细菌绿菌（*Chlorobium*）中（图 17.7a 和图 17.17b），CO_2 的固定借助柠檬酸循环的逆过程（图 5.22），该路径称为反向柠檬酸循环（reverse citric acid cycle）（图 17.24a）。绿菌具有两种与铁氧还蛋白相连接的酶，这两种酶催化 CO_2 的还原固定，成为柠檬酸循环的中间产物，所催化的反应包括将琥珀酰-CoA 羧化为 α-酮戊二酸和将乙酰-CoA 羧化为丙酮酸（图 17.24a）。反向柠檬酸循环中大部分其他的反应是由酶催化沿着与正常的氧化方向相反的方向进行，柠檬酸裂解酶（citrate lyase）就是一个例子，在绿色硫细菌中这个依赖于 ATP 的酶将柠檬酸裂解为乙酰-CoA 和草酰乙酸，而在柠檬酸循环中氧化的方向上，是由柠檬酸合酶（citrate synthase）催化乙酰-CoA 和草酰乙酸生成柠檬酸（图 5.22）。

反向柠檬酸循环作为一种自养的机制，在某些非光养极端嗜热菌中也被发现，包括古生菌（*Archaea*），如热变形菌（*Thermoproteus*）（见 13.9 节），此外还存在于产液菌（*Aquifex*）—— 一种在细菌系统发育树上分支非常早的自养生物中（图 12.1 和 12.37 节）。这些研究结果自然就留下了悬念，即反向柠檬酸循环比原先想像的分布更广，是否暗示着该途径可能是自养作用的一种“早期”进化形式。

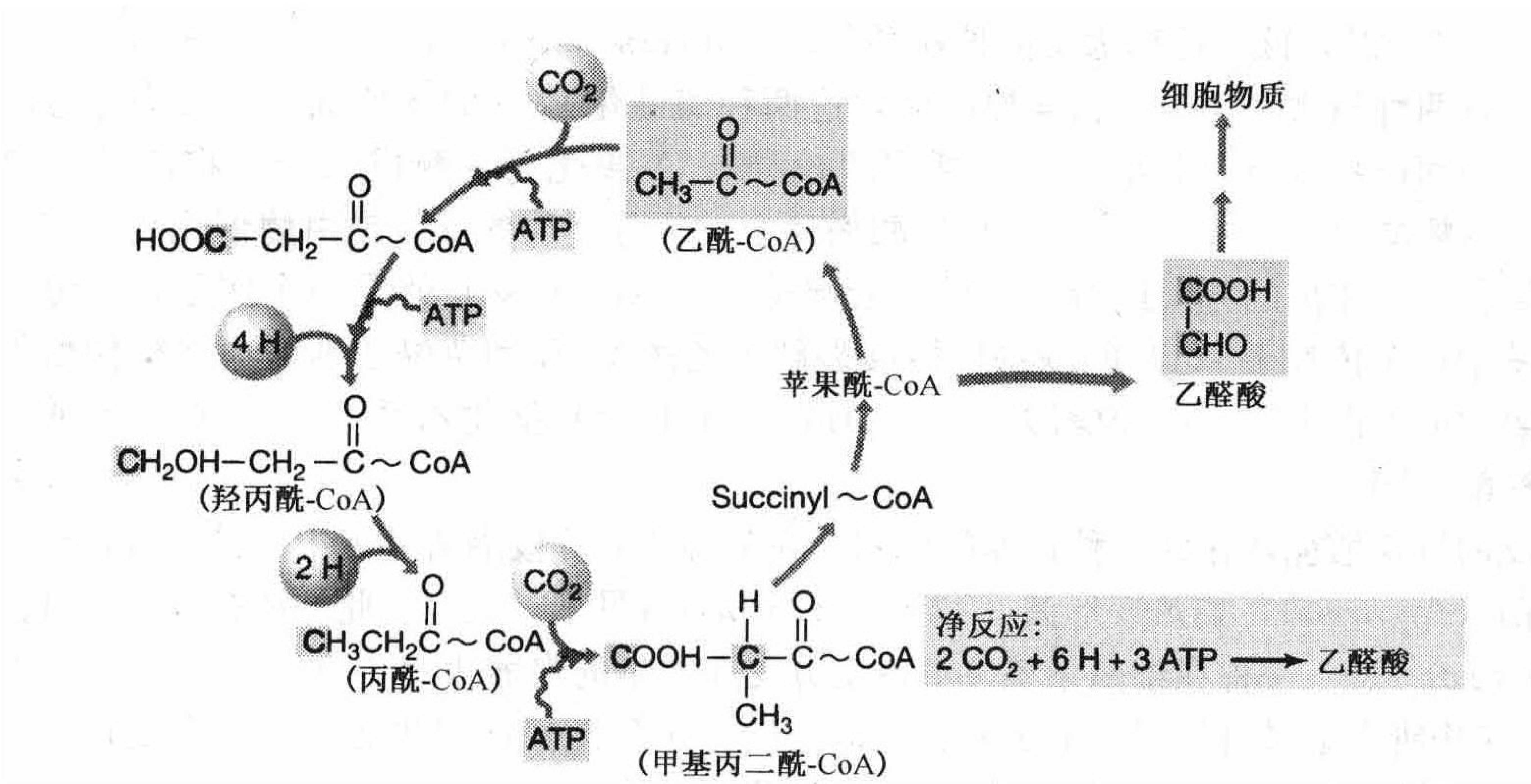
绿屈挠菌的自养

绿色非硫光养生物绿屈挠菌（见 12.35 节）以 H_2 或 H_2S 为电子供体自养生长，然而在此微生物中既不存在卡尔文循环也不存在反向柠檬酸循环，取而代之的是一条特别的循环途径，将 2 个 CO_2 分子还原成乙醛酸，该途径称为羟丙酸途径（hydroxypropionate pathway）（图 17.24b）。羟丙酸途径合成羟丙酸作为一个关键的中间体。

在光养细菌中，羟丙酸途径仅在绿屈挠菌这个细菌系统发育树上分支最早的不产氧光养生物（图 12.1）中被证实，这就暗示了羟丙酸途径可能是不产氧光养生物自养生活的首次尝试。如果绿屈挠菌正如细菌系统发育树（图 12.1）所提示的那样，比其他光养生物进化都早的话，那么羟丙酸途径可能是任何一种光养生物的第一个自养途径。但是除了绿屈挠菌外，几种极端嗜热古生菌，包括生金球形菌（*Metallosphaera*）、酸菌（*Acidianus*）和硫化叶菌（*Sulfolobus*）（见 13.9 节）也存在羟丙酸途径，这些都



(a)



(b)

图 17.24 光养绿色细菌中独特的自养途径。 (a) 反向柠檬酸循环是绿色硫细菌绿菌 (*Chlorobium*) 固定 CO_2 的机制 (图 17.17b 和 12.32 节)。铁氧还蛋白还原表明羧化反应需要还原性的铁氧还蛋白 (2H/个)，绿菌属中还原性的铁氧还蛋白由光驱动的反应产生 (图 17.18)。从草酰乙酸开始，每次循环结合 3 个 CO_2 分子产生 1 分子丙酮酸，柠檬酸被依赖于 ATP 的酶——柠檬酸裂解酶裂解，使 C_4 受体草酰乙酸再生，并生成乙酰-CoA 用于生物合成，由丙酮酸转化成磷酸烯醇丙酮酸消耗了 2 个当量的高能磷酸键。(b) 羟丙酸途径是绿色非硫细菌绿屈挠菌 (*Chloroflexus*) 的自养方式 (见 12.35 节)。乙酰-CoA 被羧化 2 次生成甲基丙二酰-CoA，这个中间产物重排后产生乙酰-CoA 和乙醛酸，后者可能通过 1 个丝氨酸或甘氨酸中间体转化为细胞物质，羟丙酸途径的还原力来自 NADPH。

是非光养原核生物，靠近古生菌域的底部。因此，羟丙酸途径的根源也许非常深，可能是自然界自养生活的最早尝试。

概念检查

反向柠檬酸循环和羟丙酸循环分别是绿色硫细菌和绿色非硫细菌固定 CO_2 的途径。

◆ 至少从3个方面（包括 CO_2 固定的路径）来论述紫色硫细菌与绿色硫细菌的区别。

◆ 包括 CO_2 固定的路径，绿色硫细菌和绿色非硫细菌之间存在的相似性及区别是什么？

Ⅱ 化能无机营养：能量来自于无机电子供体的氧化

第5章侧重于能量代谢为化能有机营养（chemoorganotrophy），即以有机物为能源的微生物。下面4节集中讨论化能无机营养（chemolithotroph），重点在于以无机物为能源这一生活方式的特征、存在问题和优势。

17.8 无机电子供体和能量学

氧化无机化合物获取能量的生物体称为化能无机营养生物。大多数化能无机营养细菌也可以从 CO_2 中获得碳原子，因此它们也是自养生物。正如我们以前所说的，以 CO_2 作为唯一碳源生长的生物体需要能量（ATP）和还原力。一些化能无机营养生物是混合营养的（mixotrophic），也就是说尽管它们能够从氧化一种无机化合物中获得能量，它们仍然需要一种有机物作为碳源。

在化能无机营养生物中，ATP 的形成原则上与化能有机营养生物的相似，只是电子供体是无机物而不是有机物。ATP 的合成与电子供体的氧化相连接，还原力可以直接来自无机化合物，只要该无机化合物有足够低的还原电位，或者可以像17.5节中所讨论过的光养紫色细菌一样，通过反向电子运输反应来获得还原力。

无机电子供体的来源

化能无机营养生物的无机电子供体有许多来源，从本质上来说可以是地质的、生物的或人为的。火山活动是还原态硫化物（主要是 H_2S）的主要来源，农业、矿物开采、化石燃料的燃烧、工业废料排放等都可增加环境中的无机电子供体，尤其是氮和铁化合物。此外，无机电子供体特别是 H_2S、H_2 和 NH_3 的生物来源也很广泛。化能无机营养生物生态上的存在（第19章）和代谢多样性（本章）表明自然界中无机电子供体的来源和供应是很丰富的。

化能无机营养的能量学

表 A1.2 所列的还原电位表明许多无机化合物以 O_2 为电子受体氧化时能够为 ATP 的合成提供足够的能量。回顾第5章所述可知，两个半反应之间的 E_0' 相差越多，所释

放出的能量也就越多。例如，H^+/H_2 电偶联和$\frac{1}{2}O_2/H_2O$ 电偶联的还原电位相差$-1.23V$，相当于产生$-237kJ/mol$ 的自由能（计算见附录 1），而 H^+/H_2 电偶联和 NO_3^-/NO_2^- 电偶联的还原电位相差较少，为$-0.84V$，相当于产生$-163kJ/mol$ 的自由能，但是这也足够用于产生 ATP（ATP 中的高能磷酸键的自由能为$-31.8kJ/mol$，表 17.6）。然而，用同样的方法可算出，若以 CO_2 作为电子受体氧化 H_2S 时将不会产生充足的能量。

这种能量计算可以预测自然界中可能存在的化能无机营养生物的种类。由于生物体必须遵循热力学定律，所以只有热力学上有利的反应才是潜在的产能反应（见 17.21 节）。表 17.1 总结了已知的在化能无机营养微生物中进行的一些反应的产能情况，微生物本身已经在第 12 章和第 13 章中被论述，我们还将在第 19 章中讲述化能无机营养生物生态学方面的内容，届时我们将会了解到化能无机营养反应是多数营养循环的核心。

表 17.1 不同无机电子供体氧化时释放的能量[a]

电子供体	反应	化能无机营养生物的种类	电偶联电位 E_0'/V	$\Delta G^{0'}$ /(kJ/反应)	电子数	$\Delta G^{0'}$ /(kJ/2e$^-$)
亚磷酸盐[b]	$4HPO_3^{2-}+SO_4^{2-}+H^+ \rightarrow 4HPO_4^{2-}+HS^-$	亚磷酸盐细菌	−0.69	−91	2	−91
氢	$H_2+\frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$	氢细菌	−0.42	−237.2	2	−237.2
硫化物	$HS^-+H^++\frac{1}{2}O_2 \rightarrow S^0+H_2O$	硫细菌	−0.27	−209.4	2	−209.4
硫	$S^0+1\frac{1}{2}O_2+H_2O \rightarrow SO_4^{2-}+2H^+$	硫细菌	−0.20	−587.1	6	−195.7
铵[c]	$NH_4^++1\frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_2^-+2H^++H_2O$	硝化细菌	+0.34	−274.7	6	−91.6
亚硝酸盐	$NO_2^-+\frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_3^-$	硝化细菌	+0.43	−74.1	2	−74.1
亚铁离子	$Fe^{2+}+H^++\frac{1}{4}O_2 \rightarrow Fe^{3+}+\frac{1}{2}H_2O$	铁细菌	+0.77	−32.9	1	−65.8

a. 根据附录 1 的数据计算得出的数值，Fe^{2+} 为 pH 2 时的数据，其他为 pH 7 时的数据，pH 7 时 Fe^{3+}/Fe^{2+} 电偶联的 E_0' 约$+0.2V$。

b. 除了亚磷酸盐以外，所有反应均结合作为电子受体的 O_2 表示，仅知的亚磷酸盐氧化反应结合电子受体 SO_4^{2-} 表示。

c. 铵也可被厌氧氨氧化生物以 NO_2^- 作为电子受体氧化（见 17.12 节）。

概念检查

化能无机营养生物能够氧化无机物作为能量和还原力的唯一来源，大多数化能无机营养生物还能进行自养生长。

◆ 化能无机营养生物利用无机化合物有哪两种用途？

◆ 为什么 H_2 氧化时以 O_2 作为电子受体比以 SO_4^{2-} 作为电子受体释放的能量更多？

17.9 氢的氧化

氢是微生物新陈代谢中一种常见的产物，许多化能无机营养生物在能量代谢过程中

能够利用氢作为电子供体。已经知道许多种厌氧的氢氧化细菌和古生菌，它们使用的电子受体不同（如硝酸盐、硫酸盐、铁离子等），这些微生物在本章的后面讨论（见 17.14～17.18 节），在这里我们只考虑需氧的氢氧化细菌。

氢氧化的能量学

在 H_2 氧化过程中，H_2 被 O_2 氧化产生 ATP，形成质子动力。总反应为：

$$H_2+\frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O \quad \Delta G^{0'}=-237kJ$$

该反应为高度放能反应，可供至少 1 个 ATP 的合成。反应由氢化酶（hydrogenase）催化，电子最初从 H_2 转移给 1 个醌受体，然后再经过一系列细胞色素，最终将 O_2 还原为水（图 17.25）。一些氢细菌存在两种氢化酶，一种是可溶的，另一种与膜结合（表 12.6）。在这种情况下，与膜结合的酶与能量有关，而可溶性的氢化酶则吸收 H_2 并将 NAD^+ 直接还原为 NADH（H_2 的还原电位很低，为 $-0.42V$，没有必要通过反向电子流产生还原力）（图 17.25）。富养罗尔斯通氏菌（*Ralstonia eutropha*）是研究需氧氢氧化的模式生物，在 12.5 节中我们讨论了该生物的一些性质。

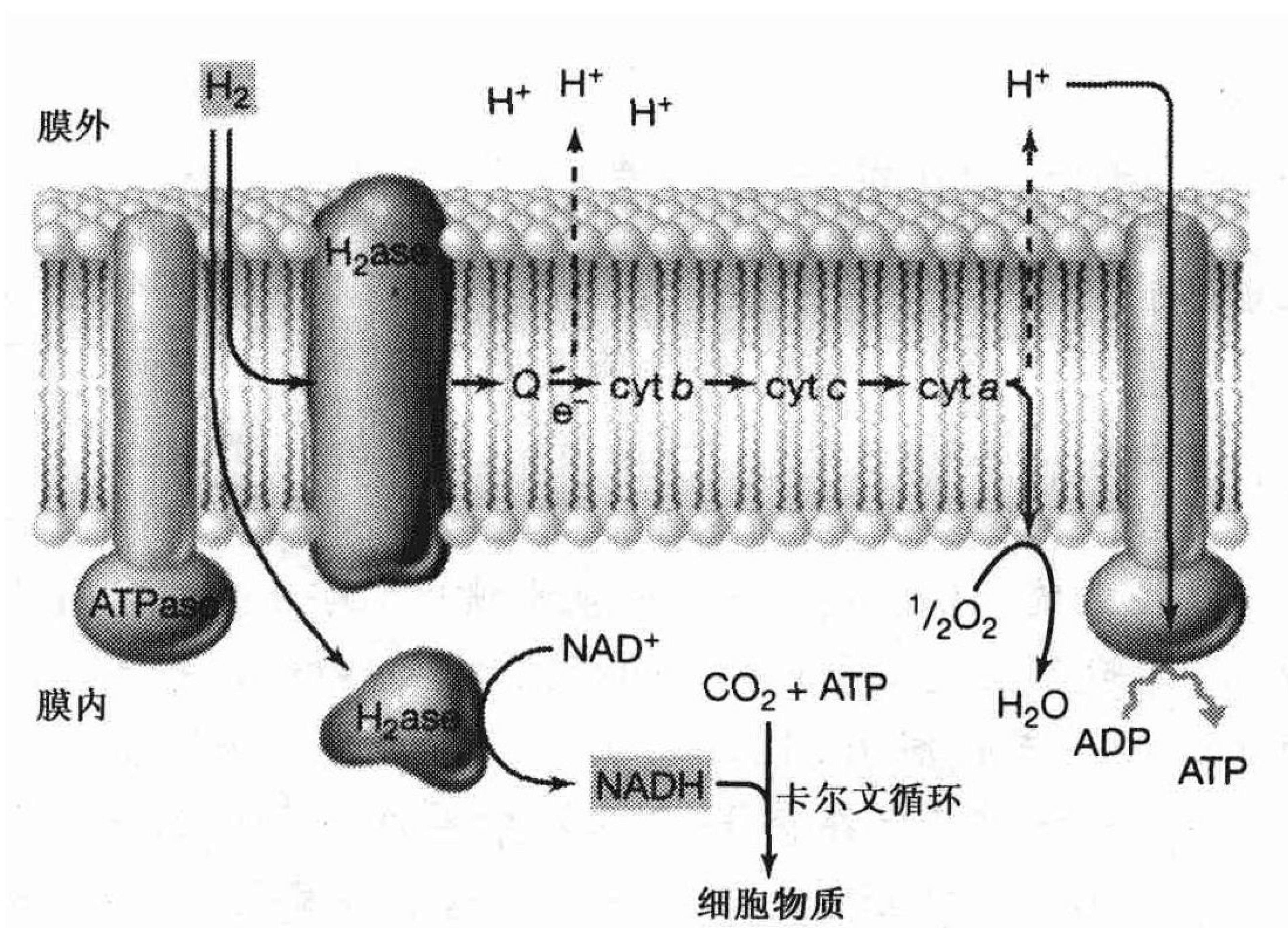


图 17.25　需氧氢细菌两种氢化酶的生物能学和功能。富养罗尔斯通氏菌（*Ralstonia eutropha*）存在两种氢化酶，膜结合的氢化酶与能量有关，而细胞质中的氢化酶产生 NADH 用于卡尔文循环。注意膜结合的氢化酶是如何产生电子流形成一个质子动力的。某些氢细菌只有膜结合的氢化酶，在这些生物中还原力的合成来自反向电子流。H_2ase：氢化酶；cyt：细胞色素；Q：醌。

氢细菌的自养作用

尽管大多数氢细菌也能够作为化能有机营养生物进行生长，当进行化能无机营养生长时，氢细菌通过卡尔文循环固定 CO_2（见 17.6 节），此时所遵守的化学定量关系为：

$$6H_2+2O_2+CO_2 \rightarrow (CH_2O)+5H_2O$$

式中：(CH_2O) 为细胞物质。然而，当易于利用的有机物（如葡萄糖）存在时，典型的氢氧化细菌中卡尔文循环酶和氢化酶的合成将被抑制。自然界中，含氧环境里 H_2 的浓度不稳定，并且在最佳情况下也不高。因此，有可能需氧氢细菌可以精细地调节分解代谢的酶类，根据生境中可利用的有机物和 H_2 的浓度水平经常在化能有机营养和化能无机营养之间进行变换。此外，许多需氧氢细菌在微量氧的条件下生长得最好。所以，作为化能无机营养生物，位于含氧/缺氧界面（oxic/anoxic interface）上的这些细菌有可能是最成功的，因为在界面上来自发酵代谢的 H_2 从供给量及供给的连续性上均优于高含氧生境。

17.10 还原态硫化合物的氧化

多数还原态硫化物可以被许多种硫细菌用作电子供体，这些硫细菌被称为无色硫细菌是为了区别于本章前面所提到的含有细菌叶绿素（有颜色的）的绿色硫细菌和紫色硫细菌（图 17.17）。实际上，化能无机营养这一概念就是来自俄罗斯伟大的微生物学家 Sergei Winogradsky 关于硫细菌的研究成果（见微生物知识窗：Winogradsky 和化能无机自养，以及 1.7 节）。

知识窗：Winogradsky 和化能无机自养

化能无机自养的概念，是由伟大的俄罗斯微生物学家 Sergei Winogradsky 首先提出的（见 1.7 节）。Winogradsky 研究硫细菌是因为某些无色硫细菌［贝日阿托氏菌 (*Beggiatoa*)、发硫菌（*Thiothrix*)］个体非常大（图 1)，即使不是在纯培养的条件下也容易研究。世界各地富含 H_2S 的泉水相当普遍，在瑞士的 Bernese Oberland 地区，大量的贝日阿托氏菌和发硫菌在含硫的泉水喷出的小水沟里繁衍生息。就是在那里，Winogradsky 发现了显微镜学和生理学研究的理想材料，并且只需捞起白色丝状的细胞堆积物（见 12.4 节；图 12.11 和图 12.13)，直接在野外进行实验即可。

Winogradsky 首先指出只有在含 H_2S 的水中存在无色硫细菌，随着水的流动，远离源头，H_2S 逐渐消失，硫细菌也不再出现。这种现象提示 Winogradsky 硫细菌的繁衍依赖于 H_2S 的存在。随后 Winogradsky 又证实，当贝日阿托氏菌的丝状体缺乏硫化物时，会失去硫颗粒。然而他发现如果添加少量的 H_2S，颗粒物又会迅速再生（图 1)。因此，他断定 H_2S 被氧化成元素硫。

但是，当丝状体缺乏 H_2S 时，硫颗粒会发生什么变化呢？Winogradsky 通过几个巧妙的微量化学实验表明，在硫颗粒消失的同时，硫酸盐出现在培养基中。因此，他得出结论：贝日阿托氏菌（其他无色硫细菌也可同理推断出）将 H_2S 氧化为元素硫，元素硫随后又被氧化为硫酸盐（$H_2S \rightarrow S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$）。因为这些生物在泉水中繁殖需要 H_2S，所以他进一步提出假设：这种氧化过程是这些生物的主要能量来源。

Winogradsky 关于贝日阿托氏菌的研究为生物体能够氧化无机物作为能源提供了第一个证据，这也就是化能无机营养这一概念的起源。从此以后，Winogradsky 开始转向研究硝化细菌，正是通过硝化细菌，他首次证明自养型 CO_2 的固定与一种无机

化合物的氧化相偶联。在 Winogradsky 的工作之前，人们就已经通过研究污水排放到土壤里的结果，了解到硝化作用的过程。例如，富含氨的污水通过一个装有土壤的柱子后可以转化出硝酸盐。Winogradsky 从此着手，利用以 CO_2 为唯一碳源，以氨为唯一电子供体的完全矿物质培养基去分离硝化细菌。因为氨在化学性质上是稳定的，因此易于证明，从氨到亚硝酸盐，再到硝酸盐的氧化确实是细菌的作用。

实际上，Winogradsky 进一步证实，硝化作用是一个两步反应，一组生物将 NH_4^+ 转变为 NO_2^-，第二组将 NO_2^- 转变为 NO_3^-（见 17.12 节）。由于培养基中没有有机物存在，因此还有可能说明有机物质（菌体细胞物质）的形成来自 CO_2。当从培养基中去除氨或亚硝酸盐后，菌体不再生长。精细化学分析表明，细菌合成有机物质的量与其所氧化的氨或亚硝酸盐的量呈正比。Winogradsky 得出结论："这种过程与经典的生理学说相矛盾，经典生理学说认为自然界中除了通过含有叶绿素的植物的光合作用外，不会实现有机物质的全合成"。因此就产生了化能无机自养的概念。

现在我们知道，至少在一方面，多数化能无机营养生物与光养生物的自养是相同的，即在两类生物中，CO_2 固定的途径遵循同样的涉及二磷酸核酮糖羧化酶（见 17.6 节）的生化反应步骤（卡尔文循环）。

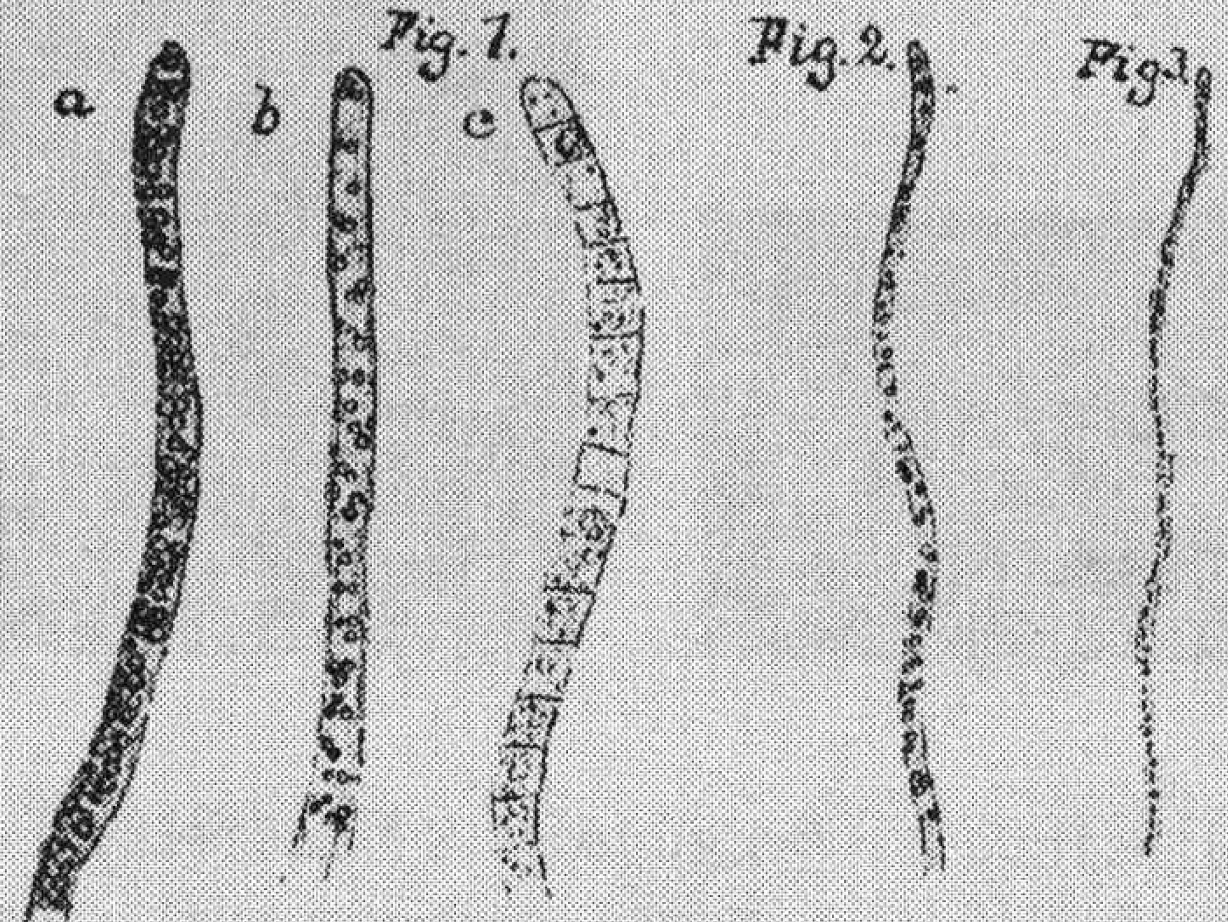


图 1　贝日阿托氏菌（*Beggiatoa*）和化能无机营养。Winogradsky 绘制的贝日阿托氏菌草图及图注译文（译自法文）。"图 1 白色贝日阿托氏菌（*Beggiatoa alba*）菌丝体的顶端。(a) 在含硫（含有硫化物）的水中。(b) 24h 后在 H_2S 几乎耗尽的水中。(c) 48h 后在无 H_2S 的水中（注意随着时间硫颗粒逐渐减少）。图 2 中型贝日阿托氏菌（*Beggiatoa media*）菌丝体的顶端。图 3 最小贝日阿托氏菌（*Beggiatoa minima*）菌丝体的顶端。"摘自：Winogradsky S. 1949. *Microbiologie du Sol*. *Masson*, *Paris*。

硫氧化的能量学

最常见的用作电子供体的硫化合物是硫化氢（H_2S）、元素态硫（S^0）和硫代硫酸盐（$S_2O_3^{2-}$）。多数情况下硫氧化的最终产物是硫酸盐（SO_4^{2-}）、H_2S（氧化态，-2）和硫酸盐（氧化态，$+6$）之间涉及的电子总数为 8（表 17.3，硫氧化态汇总表），当利用其中的一种中间硫氧化态时，可用的能量较少：

$$H_2S + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$$

（终产物，硫酸盐） $\Delta G^{0'} = -798.2\text{kJ}/$反应

$$HS^- + \frac{1}{2}O_2 + H^+ \rightarrow S^0 + H_2O$$

（终产物，硫） $-209.4\text{kJ}/$反应

$$S^0 + H_2O + 1\frac{1}{2}O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$$

（终产物，硫酸盐） $-587.1\text{kJ}/$反应

$$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2O_2 \rightarrow 2SO_4^{2-} + 2H^+$$

（终产物，硫酸盐） $-818.3\text{kJ}/$反应

（$-409.1\text{kJ}/$被氧化的S原子）

还原态最高的硫化合物——H_2S 的氧化过程是逐步进行的。第一步形成元素态硫——S^0，某些 H_2S 氧化菌将这种元素态硫沉积在细胞内（图 17.26a）。初始氧化产物硫的沉积是一种能量的储备，当 H_2S 的供给衰竭时，就可以从硫到硫酸盐的氧化过程中获得额外的能量。

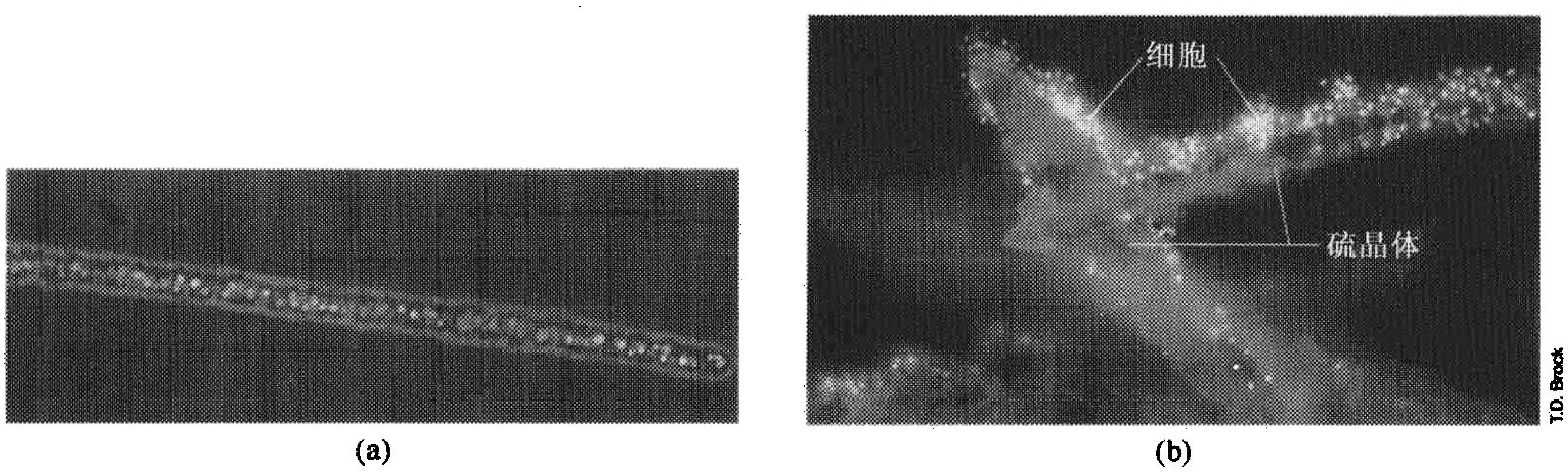


图 17.26 硫细菌。（a）贝日阿托氏菌（*Beggiatoa*）内源硫颗粒的沉积。（b）硫氧化古核生物嗜酸热硫化叶菌（*Sulfolobus acidocaldarius*）黏附在元素硫晶体上，细胞用吖啶橙染料染色，用荧光显微镜观察显示，硫晶体无荧光。见图 17.27，以了解硫化物和硫是如何被氧化产生 ATP 的。

当利用外源的元素态硫作为电子供体时，由于元素态硫的极端不溶性，生物体必须贴着硫颗粒进行生长（图 17.26b）。黏附在硫颗粒上后，生物体能够利用硫原子，将其氧化为硫酸盐。据推测是膜或周质蛋白的作用溶解了硫，可能是先将 S^0 还原为 HS^-，再输送进细胞，进入化能无机营养代谢（图 17.27）。

硫氧化反应的一个产物是 H^+，质子的产生将降低 pH，因此，还原态硫化合物氧化的一个结果是培养基的酸化。硫细菌产生的酸是一种强酸——硫酸（H_2SO_4），因此硫细菌经常能使培养基的 pH 明显降低。

硫氧化的生物化学和能量学

图 17.27 总结了不同硫化合物氧化的生化步骤。从硫化物开始，产生亚硫酸盐（SO_3^{2-}），这是一个涉及 6 个电子的氧化反应。如果 S^0 是起始底物，也会产生亚硫酸盐，尽管 S^0 必须首先被还原成硫化物（图 17.27a）。有两种方法可将 SO_3^{2-} 氧化成 SO_4^{2-}，最普遍的方法是利用亚硫酸盐氧化酶（sulfite oxidase）催化法。亚硫酸盐氧化酶可将电

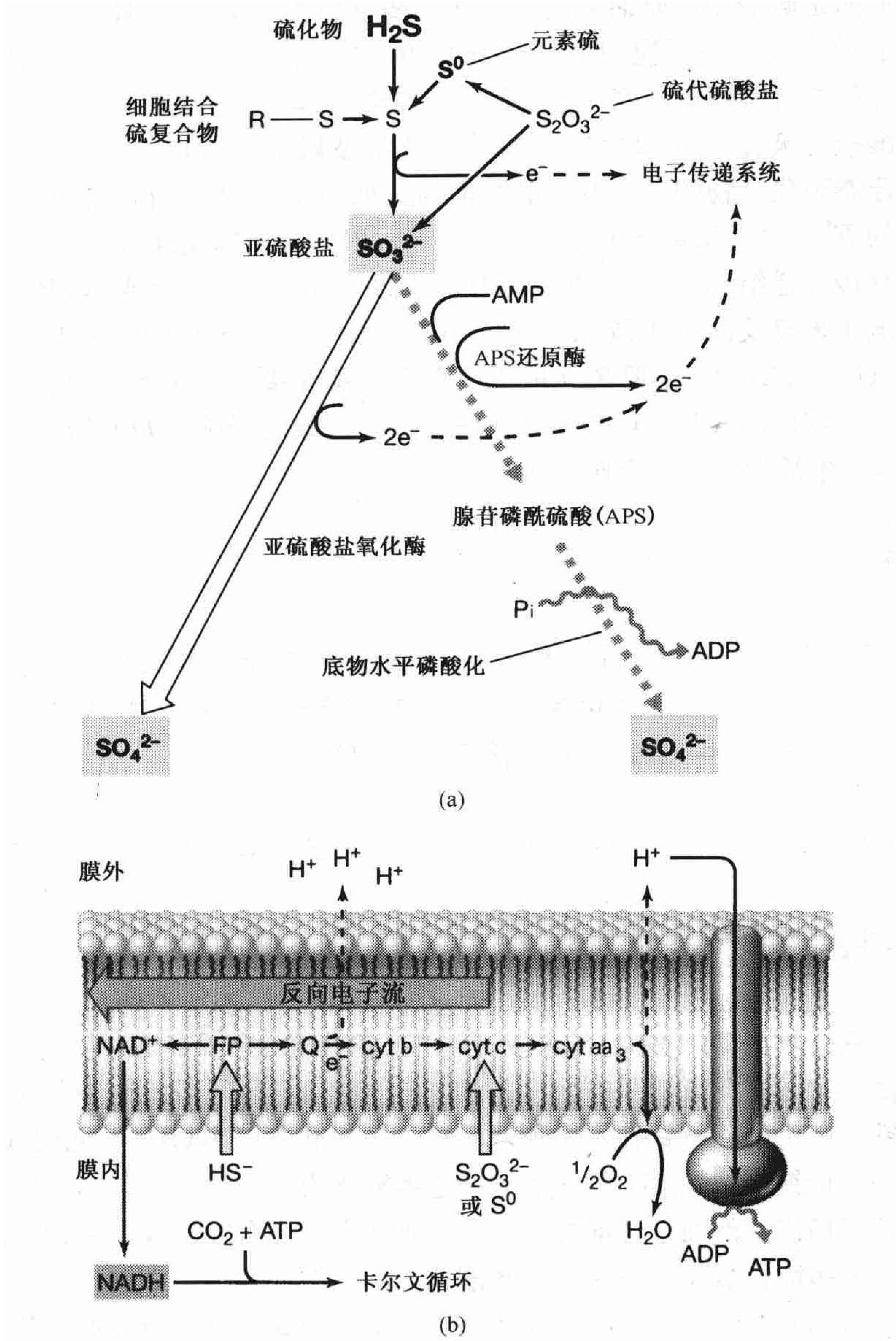


图 17.27 硫化能无机营养生物对还原态硫化合物的氧化。 (a) 不同化合物的氧化步骤，大多数亚硫酸盐通过亚硫酸盐氧化酶途径被氧化。(b) 来自硫化合物的电子进入电子传递链以驱动质子动力，来自硫代硫酸盐和元素硫的电子从细胞色素 c 的位置进入。由于电子供体的 E_0' 正电性高于 NAD$^+$/NADH 的 E_0'，因此 NADH 必须通过反向电子流的耗能反应来产生。Cyt：细胞色素；FP：黄素蛋白；Q：醌。APS 的结构见图 17.38。

子从 SO_3^{2-} 直接转移给细胞色素 c，在电子传递和质子动力形成的过程中产生 ATP（图 17.27b）。

除了亚硫酸盐氧化酶外，少数硫化能无机营养生物可以通过腺苷磷酰硫酸（adenosine phosphosulfate，APS）还原酶（reductase）的逆反应将 SO_3^{2-} 氧化成 SO_4^{2-}，腺苷

磷酰硫酸还原酶是硫酸盐还原细菌代谢的必需酶（将图 17.27a 与图 17.38 进行比较）。硫化能无机营养生物使该反应朝着形成 SO_4^{2-} 的方向进行，随着 AMP 被转化成 ADP，产生一个高能磷酸键（图 17.27a）。当硫代硫酸盐作为硫化能无机营养生物的电子供体时，硫代硫酸盐可被分成 S^0 和 SO_3^{2-}，两者最终都被氧化成 SO_4^{2-}。

来自还原态硫化合物的所有电子最终都到达如图 17.27b 所示的电子传递系统。根据电子供体的 E_0'，电子从黄素蛋白（E_0'=～−0.2V）或细胞色素 c（E_0'=+0.3V）的位置进入，穿梭传递给 O_2，产生质子动力，从而导致 ATPase 合成 ATP。自养型 CO_2 固定所需的电子来自反向电子流（见 17.5 节），最终产生 NADH，而 CO_2 通过卡尔文循环被固定（图 17.27b）。尽管硫化能无机营养生物主要是需氧型生物（见 12.4 节），但是一些种类能够以硝酸盐为电子受体厌氧生长，脱氮硫杆菌（*Thiobacillus denitrificans*）就是这种生活方式的一个典型例子。

概念检查

H_2 和还原态硫化合物，如 H_2S 和 S^0，是化能无机营养生物极佳的电子供体，这些化合物可以分别被氢细菌或硫细菌氧化，从而产生质子动力并合成 ATP。这些化能无机营养生物也是自养生物，通过卡尔文循环固定 CO_2。

◆ 利用 H_2 生长需要什么特殊酶？

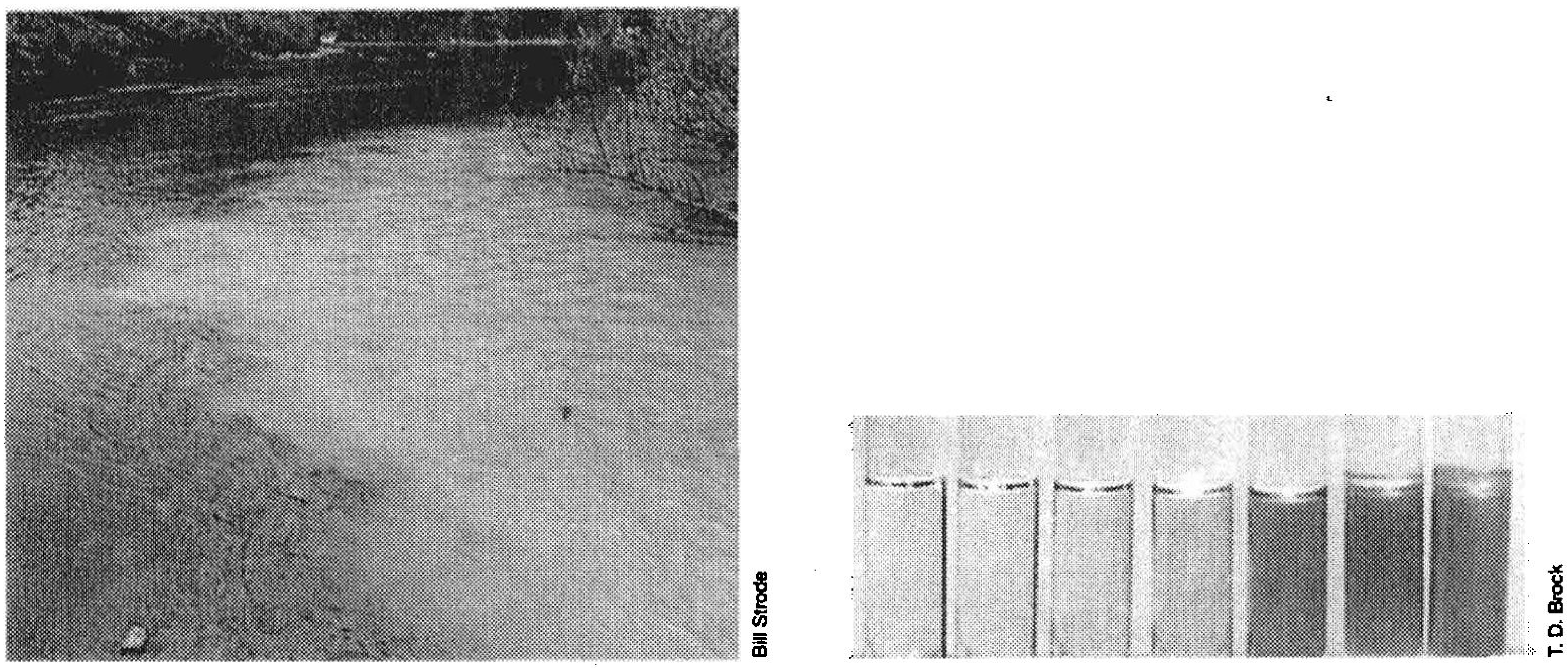
◆ 如果 S^0 为终产物，氧化 H_2S 可以获得多少电子？如果 SO_4^{2-} 为终产物呢？

17.11 铁的氧化

对一些原核生物来说，铁从二价态（Fe^{2+}）到三价态（Fe^{3+}）的需氧氧化是一种放能反应，由于这种氧化反应只产生少量的能量（表 17.1），因此铁细菌为了生长必须氧化大量的铁。产生的三价铁在水中形成不溶的氢氧化铁[$Fe(OH)_3$]沉淀（图 17.28），其部分原因是二价铁在中性 pH 条件下会迅速地氧化为三价铁，因此二价铁只有在无氧条件下才会长期稳定。然而，在酸性 pH 下，亚铁离子在有氧条件下是稳定的，这样就解释了为什么大多数铁氧化细菌是专性嗜酸菌了。

最为人们所熟知的铁氧化细菌，氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）和铁氧化钩端螺菌（*Leptospirillum ferrooxidans*），均能以二价铁作为电子供体自养生长（图 17.28b），也均能在 pH 低于 1 的条件下生长，这些生物体在酸污染的环境，如采煤场中非常普遍（图 17.28a）。一种称为铁原体（*Ferroplasma*）的古生菌，是一种极端嗜酸的铁氧化菌，甚至能够在 pH 低于 0 的条件下生长（见 13.5 节）。我们将在 19.14 节和 19.15 节中讨论所有这些生物在酸矿污染和矿物质氧化中的作用。

尽管 Fe^{2+} 在中性 pH 下不稳定，但是有许多生长很好的铁氧化细菌在二价铁可以从缺氧条件转移到有氧条件的中性环境中。在缺氧区和有氧区的界面，来自缺氧环境的 Fe^{2+} 在其自发氧化之前能够被铁细菌氧化。锈色嘉利翁氏菌（*Gallionella ferruginea*）和浮游球衣菌（*Sphaerotilus natans*）就是生活在上述界面的微生物实例，经常会看见它们与自身所形成的特征性沉积物混合在一起（图 17.29，同时参见图 12.43a）。



(a)　　　　　　　　　　　　　　　　(b)

图 17.28　铁氧化细菌。（a）酸矿排水沟，一条普通河流与一条煤矿区小河的汇合处，酸性煤矿区小河富含二价铁（Fe^{2+}），低 pH 时，二价铁在空气中不会自发氧化，但是可被氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）氧化，不溶性的氢氧化铁和三价铁盐复合物沉淀下来，形成了被煤矿工人称为"黄孩子"的沉积物。（b）氧化亚铁嗜酸硫杆菌的培养物，显示的是一个稀释系列，试管中无生长的在左边，从左至右生长量逐渐增加，二价铁（Fe^{2+}）氧化成三价铁（Fe^{3+}）后，易于形成 $Fe(OH)_3$，变成酸性，呈现出橘黄色[$Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow Fe(OH)_3 + 3H^+$]，因此生长是显而易见的。

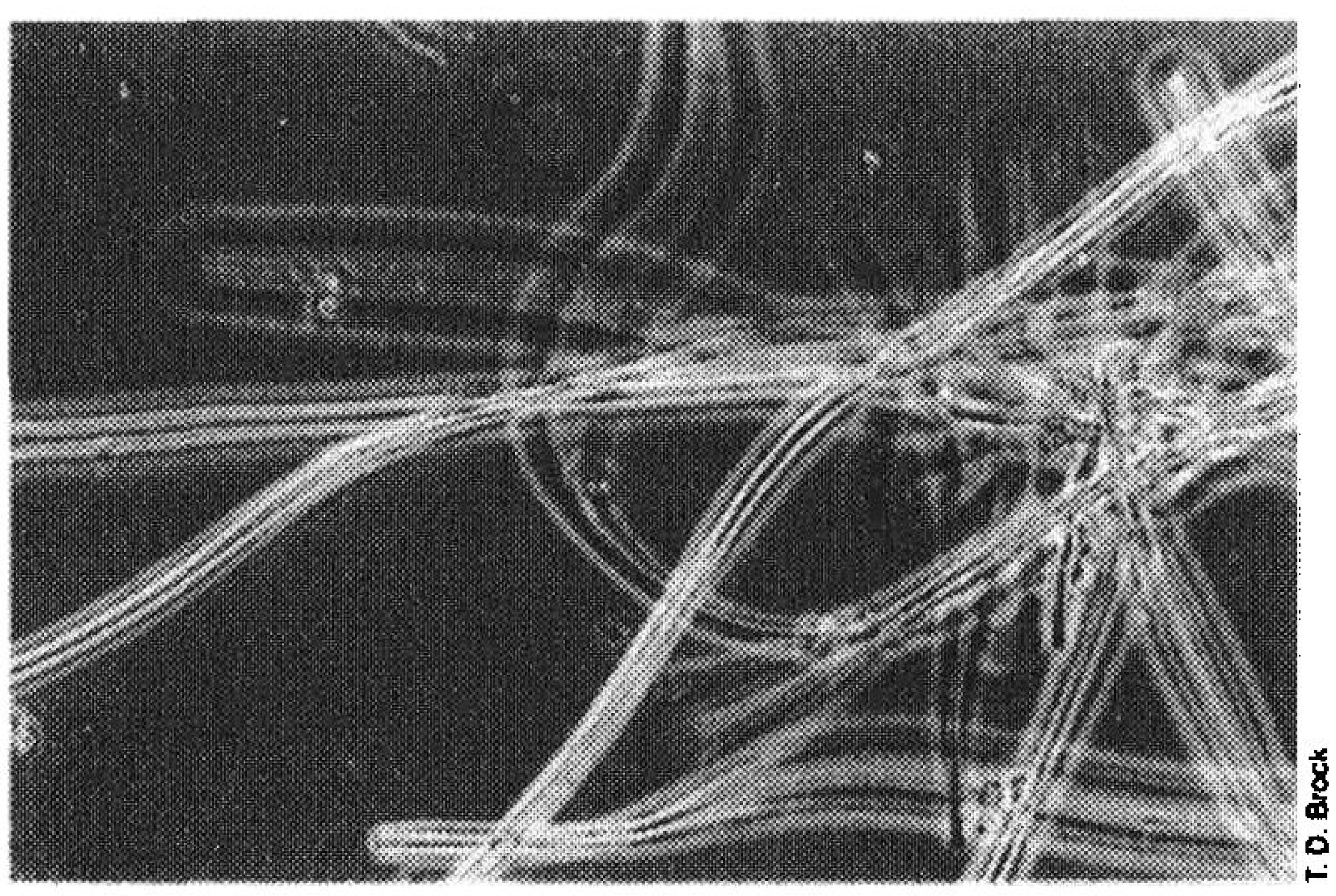


图 17.29　中性 pH 下的铁细菌：球衣菌属（*Sphaerotilus*）。采集于一个小沼泽边缘渗漏区的球衣菌空的被铁包裹外鞘的相差显微图片。球衣菌是一个典型的界面生物，生活在缺氧的含有二价铁的水与有氧区接触的生境中。

二价铁氧化产生的能量

由于 Fe^{3+}/Fe^{2+} 电偶联具有正的还原电位（pH 2 时为+0.77V），氧化亚铁嗜酸硫杆菌氧化铁的生物能学令人关注。氧化亚铁嗜酸硫杆菌的呼吸链包括 c 型和 a 型细胞色素，以及一种含铜的被称为铁硫菌蓝蛋白（rusticyanin）的周质蛋白（图 17.30）。因为 Fe^{3+}/Fe^{2+} 电偶联的还原电位很高，所以电子传递到氧（$\frac{1}{2}O_2/H_2O$，$E_0' = +0.82V$）的途径可以很短。

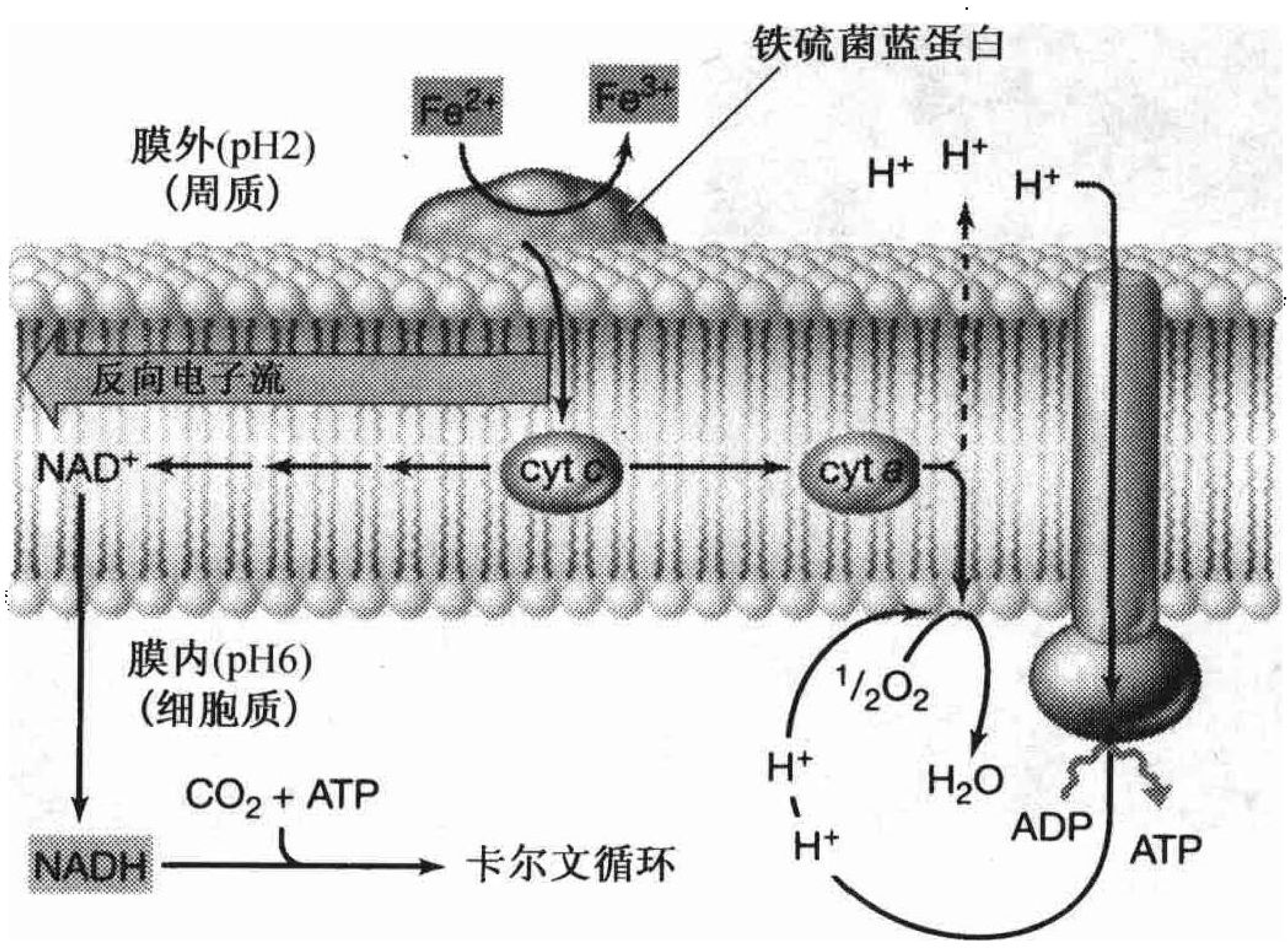


图 17.30 氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）在 Fe^{2+} 氧化过程中的电子流。含铜的周质蛋白铁硫菌蓝蛋白是 Fe^{2+} 的中间电子受体，电子从铁硫菌蓝蛋白开始经过一个短的电子传递链将 O_2 还原为 H_2O。驱动卡尔文循环的还原势来自反向电子流的反应。注意相差极大的跨膜 pH 梯度（约 4 个单位）。

二价铁的氧化始于细胞周质，由铁硫菌蓝蛋白将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}，这是一个单电子的转换反应，然后铁硫菌蓝蛋白将细胞色素 c 还原，细胞色素 c 随后将细胞色素 a 还原，细胞色素 a 则直接与 O_2 作用形成 H_2O（图 17.30），然后通过膜内的质子转移 ATPase 合成 ATP，由于电子供体的电位高，通常 ATP 的产量低。

由于氧化亚铁嗜酸硫杆菌的跨膜天然质子梯度大（细胞周质的 pH1～2，而细胞质的 pH5.5～6），通过 ATPase 进入细胞质的质子必须被消耗以便使胞内的 pH 维持在可接受的范围内（图 17.30）。质子在 H_2O 的产生过程中被消耗，但是该反应还需要电子，这些均来自 Fe^{2+}：

$$2Fe^{2+} + \frac{1}{2}O_2 + 2H^+ \rightarrow 2Fe^{3+} + H_2O$$

因此，只要氧化亚铁嗜酸硫杆菌具有可供使用的 Fe^{2+}，它就会利用跨细胞质膜的天然质子动力进行 ATP 的合成（图 17.30）。

氧化亚铁嗜酸硫杆菌的自养作用由卡尔文循环所驱动，并且由于电子供体——Fe^{2+} 的电位高，为了获得促使 CO_2 固定所必需的还原势（NADH），在反向电子流反应中要消耗许多的能量。生物合成是高度需能的，因此，氧化亚铁嗜酸硫杆菌能量产量较低意味着它必须氧化大量的 Fe^{2+}，以便产生甚至是很少量的细胞物质。因此，在嗜酸的铁氧化细菌生长旺盛的环境中，它们的存在不是由形成许多细胞物质而是由存在大量的三价铁沉淀所显现（图 17.28 和图 19.37）。我们会在 19.14 节和 19.15 节中讨论与铁氧化细菌相关的重要生态反应。

不产氧光养生物的二价铁氧化过程

二价铁在缺氧条件下可被某种不产氧光养细菌所氧化（图 17.31），在这种情况下，

二价铁不是作为能量代谢的电子供体，而是作为还原 CO_2 的电子供体（自养作用）。在这些菌体可以旺盛生长的中性 pH 下，Fe^{3+}/Fe^{2+} 电偶联的还原电位（约 0.2V）的正电性比 pH 2 时的低得多，这样，来自 Fe^{2+} 的电子能够还原紫色细菌光系统中的细胞色素 c（见 17.5 节中有关不生氧光合作用的内容）。所提到的这些细菌是光养紫色细菌中的种类（图 17.31b），它们还可以利用 FeS 为电子供体，在这种情况下，Fe^{2+} 和 S^{2-} 均作为电子供体而被氧化。

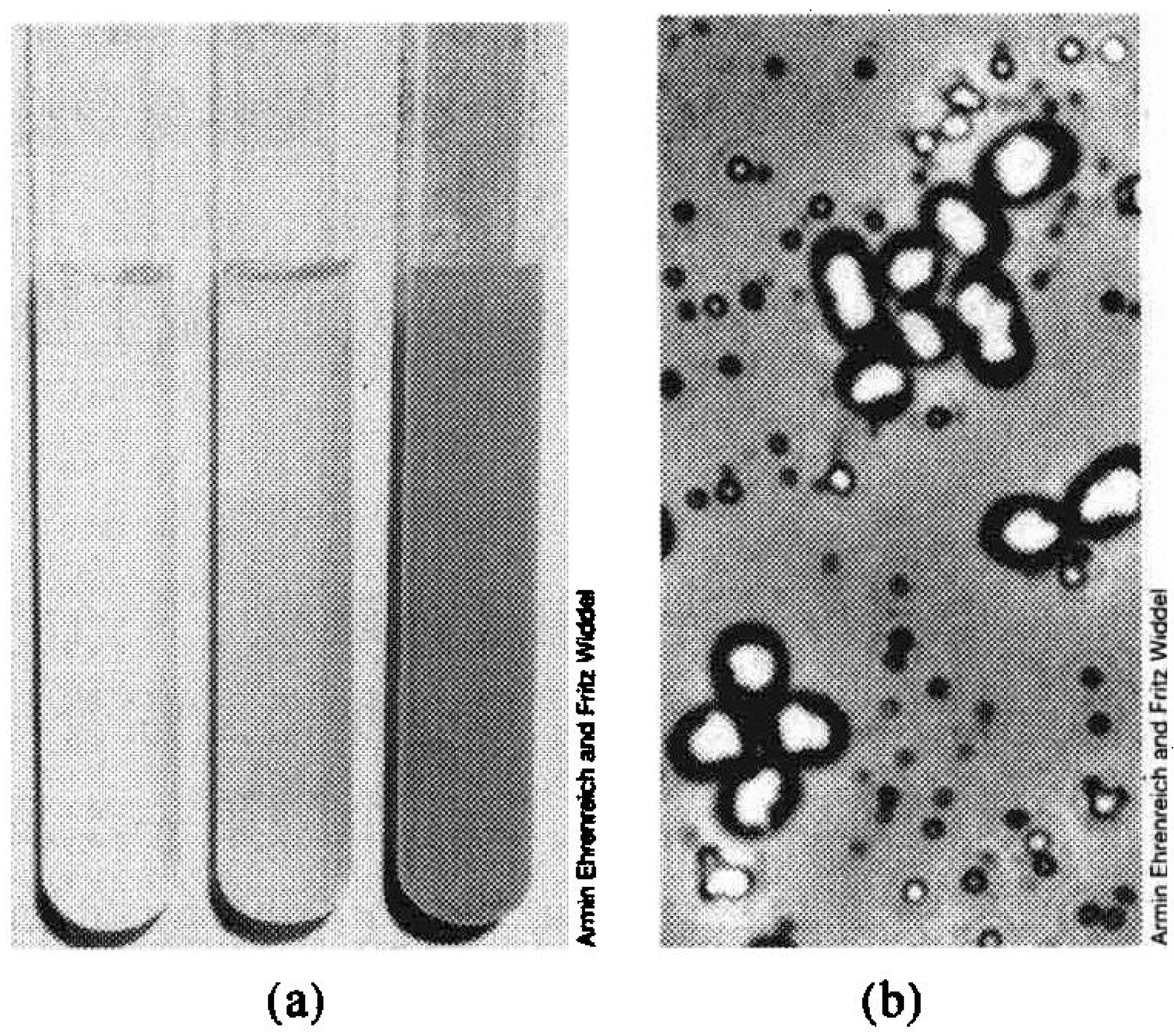


图 17.31　不产氧光养细菌二价铁的氧化。（a）无氧试管培养物中 Fe^{2+} 的氧化，从左至右依次为：无菌培养基、已接种培养基、正在生长的培养物，红棕色主要是由 $Fe(OH)_3$ 沉淀产生。（b）铁氧化紫色细菌的相差显微照片，细胞内明亮的折光区是气泡囊（见 4.12 节），细胞外的颗粒是铁沉淀物，这种微生物在系统分类上与紫色硫细菌着色菌（*Chromatium*）相关（见 12.2 节）。

某种光养绿色硫细菌（绿菌属，见 12.32 节）也能利用 Fe^{2+} 作为光合电子供体。此外，已分离出多种化能自养的反硝化细菌，它们能够将 Fe^{2+} 的氧化与 NO_3^- 至 N_2 的还原过程相耦合，并且在缺氧条件下生长。尽管如此，像需氧铁细菌一样，在这些生物体中能量和所需还原势的电子供体均为铁。

Fe^{2+} 氧化光养生物的发现，对光合作用进化历程的理解和对古沉积物中所发现的大量三价铁沉淀的解释，都具有重要的意义。这些三价铁以前被认为是由产氧光养生物所产生的 O_2 氧化 Fe^{2+} 而形成的（见 11.1 节）。然而，根据这些沉积物的年代，三价铁更有可能是由不产氧光养生物在无氧条件下氧化 Fe^{2+} 形成的。

概念检查

铁细菌是化能自养生物，能够利用二价铁（Fe^{2+}）作为唯一的能源。大多数铁细菌仅生长在酸性 pH 条件下，并常与采煤和采矿所造成的酸污染有关。一些光养紫色细菌能够在无氧条件下将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}。

◆ 为什么在酸性 pH 条件下，从 Fe^{2+} 到 Fe^{3+} 的氧化反应只产生极少量的能量？

◆ 铁硫菌蓝蛋白的功能是什么？存在于细胞中的什么位置？

◆ 在无氧条件下 Fe^{2+} 是如何被氧化的?

17.12 硝化作用和厌氧氨氧化

被用作电子供体的最常见的无机氮化合物是氨(NH_3)和亚硝酸盐(NO_2^-),它们可被化能无机营养的硝化细菌(nitrifying bacteria)(见 12.3 节)通过硝化作用(nitrification)在有氧条件下氧化。硝化细菌广泛分布于土壤和水中,其中有一类亚硝化细菌,亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*)是其中一个属,能将氨氧化成亚硝酸盐,另一类硝化杆菌(*Nitrobacter*),能将亚硝酸盐氧化成硝酸盐。因此,从氨完全氧化为硝酸盐(共传递 8 个电子)是由以上两类生物协同进行的(见"微生物知识窗")。

硝化作用的生物能学和酶学

来自氮化合物的电子进入电子传递链,电子流建立了一个与 ATP 合成相偶联的质子动力。然而由于电子供体还原电位的原因,硝化细菌面临着与硫化能无机营养生物相同的生物产能问题。NO_2^-/NH_3 电偶联(NH_3 氧化中的第一步反应)的 E_0' 为+0.34V,而 NO_3^-/NO_2^- 电偶联的 E_0' 更高,约为+0.43V。这些比较高的还原电位意味着在整个反应过程的后期步骤,硝化细菌必须为电子传递链提供电子,这就限制了能量释放和每对电子所能产生的 ATP 的数量。

将还原态的氮化合物进行氧化涉及几个关键酶。在氨氧化细菌中,NH_3 被氨单加

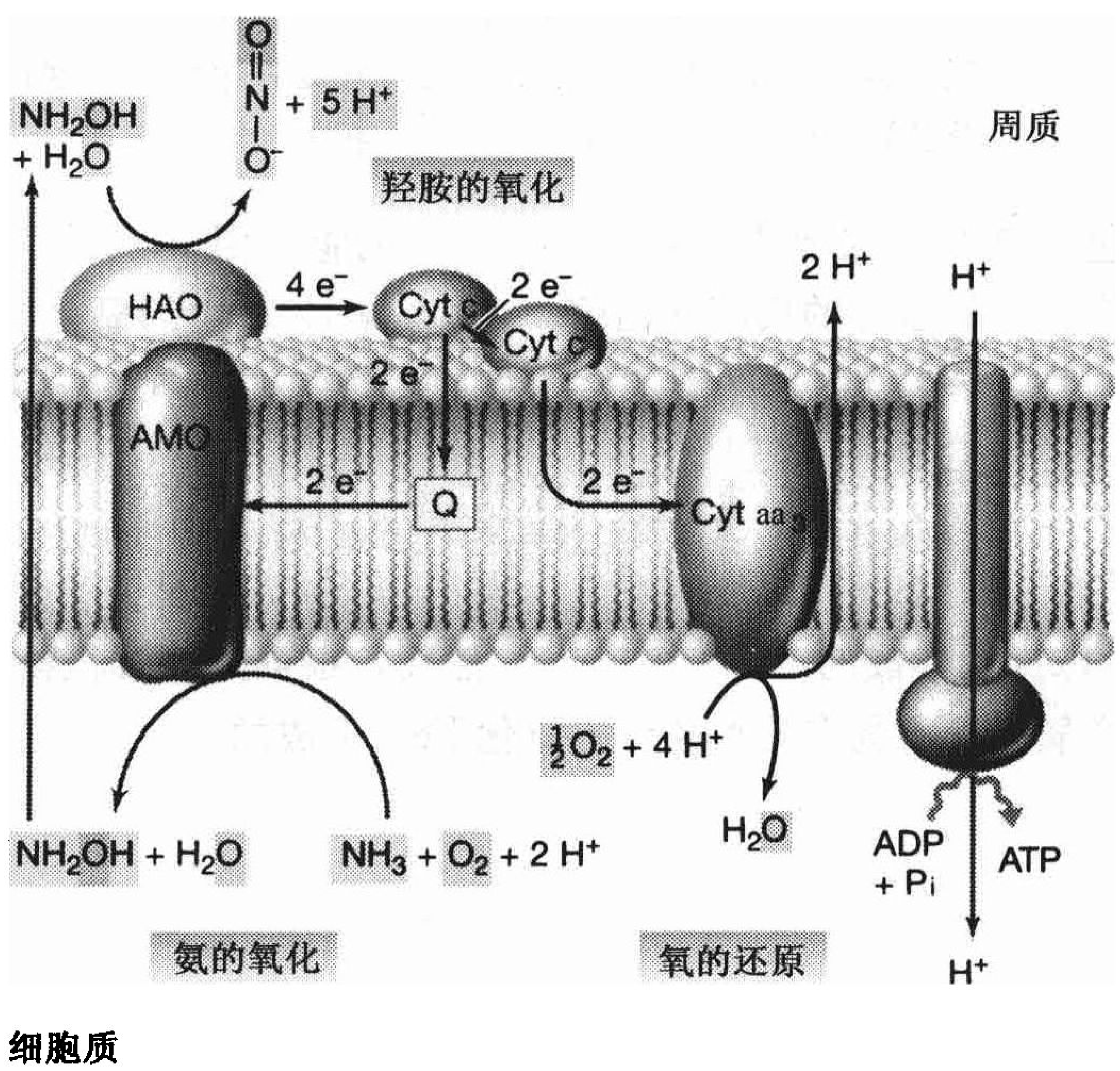


图 17.32 氨氧化细菌中氨的氧化和电子流。系列反应的反应物和产物均在图中重点标出,周质中的细胞色素 c(Cyt c)与膜中的细胞色素 c 不同。AMO:氨单加氧酶;HAO:羟胺氧化还原酶;Q:泛醌。

氧酶（ammonia monooxygenase)（见 17.22 节中有关单加氧酶的论述）氧化，产生 NH_2OH和 H_2O（图 17.32)。接着羟胺氧化还原酶（hydroxylamine oxidoreductase）将 NH_2OH 氧化成 NO_2^-，在反应过程中转移 4 个电子。氨单加氧酶是一种膜整合蛋白，而羟胺氧化还原酶存在于周质中（图 17.32)。在氨单加氧酶催化的反应中：

$$NH_3 + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NH_2OH + H_2O$$

需要 2 个外源电子加上 2 个质子将 1 个氧原子还原为水。这些电子来自羟胺的氧化，并通过细胞色素 c 和泛醌从羟胺氧化还原酶传递给氨单加氧酶（图 17.32)。这样，每 4 个由 NH_3氧化成 NO_2^-产生的电子中，实际上只有 2 个电子到达终端氧化酶（细胞色素 aa_3，图 17.32)。

亚硝酸盐氧化细菌利用亚硝酸盐氧化还原酶（nitrite oxidoreductase）将亚硝酸盐氧化成硝酸盐，电子通过 1 个极短的电子传递链（因为 NO_3^-/NO_2^- 电偶联具有高电位）传给终端氧化酶（图 17.33)。a 型和 c 型细胞色素存在于亚硝酸盐氧化菌的电子传递链中，并通过细胞色素 aa_3的反应产生 1 个质子动力（最终驱动 ATP 的合成)(图 17.33)。与铁氧化一样（见 17.11 节)，通过该反应也仅有少量的能量可以被利用，因此硝化细菌的生长率低。

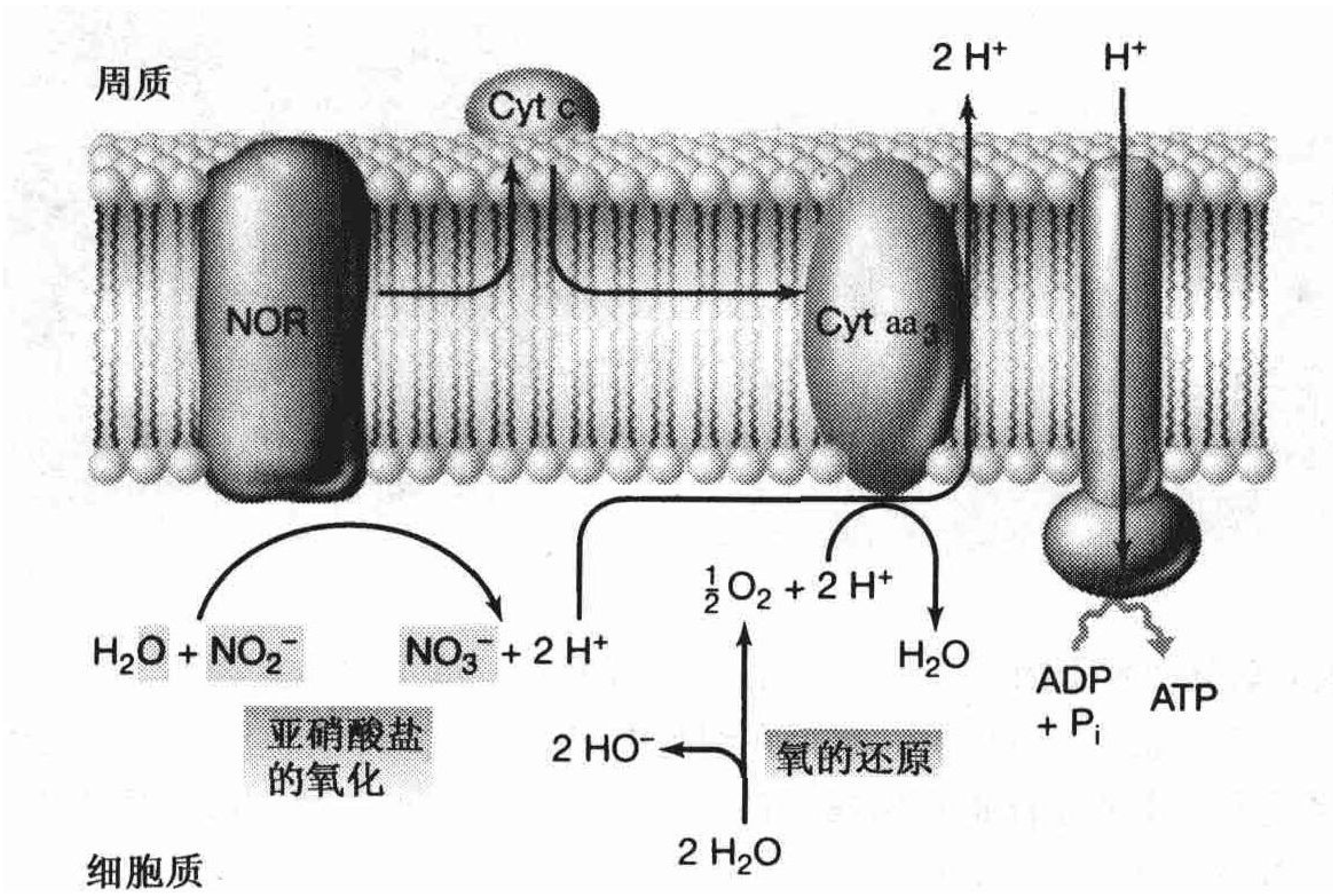


图 17.33　硝化细菌将亚硝酸盐氧化成硝酸盐。系列反应的反应物和产物均在图中着重标出。NOR：亚硝酸盐氧化还原酶。

硝化细菌的碳代谢

与硫氧化和铁氧化化能无机营养生物一样，好氧的硝化细菌通过卡尔文循环固定 CO_2，该过程对 ATP 和还原力的需求额外地增加了原本已是低效的产能系统的负担（驱动卡尔文循环的 NADH 通过反向电子流形成)。对于亚硝酸盐氧化菌来说这种能量的不足尤为严重，可能正是由于此原因，大多数亚硝酸盐氧化菌还能依赖于葡萄糖或某种其他的有机底物进行化能有机营养生长（见 12.3 节)。

厌氧氨氧化：anammox

虽然典型的硝化细菌至少在以还原态氮为底物生长时是严格的好氧菌，然而在无氧条件下氨也能被氧化。该反应被称为 anammox（厌氧氨氧化），这是一个高度放能反应，与所涉及生物体的能量代谢相连接。厌氧氨氧化以亚硝酸盐为电子受体氧化氨，产生氮气：

$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O \quad \Delta G^{0'} = -357kJ$$

催化厌氧氨氧化的生物体，厌氧氨氧化布罗卡德氏菌（*Brocadia anammoxidans*），是系统发育上浮霉状菌门细菌中独特的一员（见 12.28 节和图 17.34）。浮霉状菌是与众不同的一类细菌，缺少肽聚糖，细胞中含有被膜包裹的组分，包括一个类似于真核细胞细胞核的组织（见 12.28 节）。在厌氧氨氧化布罗卡德氏菌中，存在一个巨大的被称为厌氧氨氧化体（anammoxosome）的组分，这是厌氧氨氧化反应发生的场所（图 17.34b）。

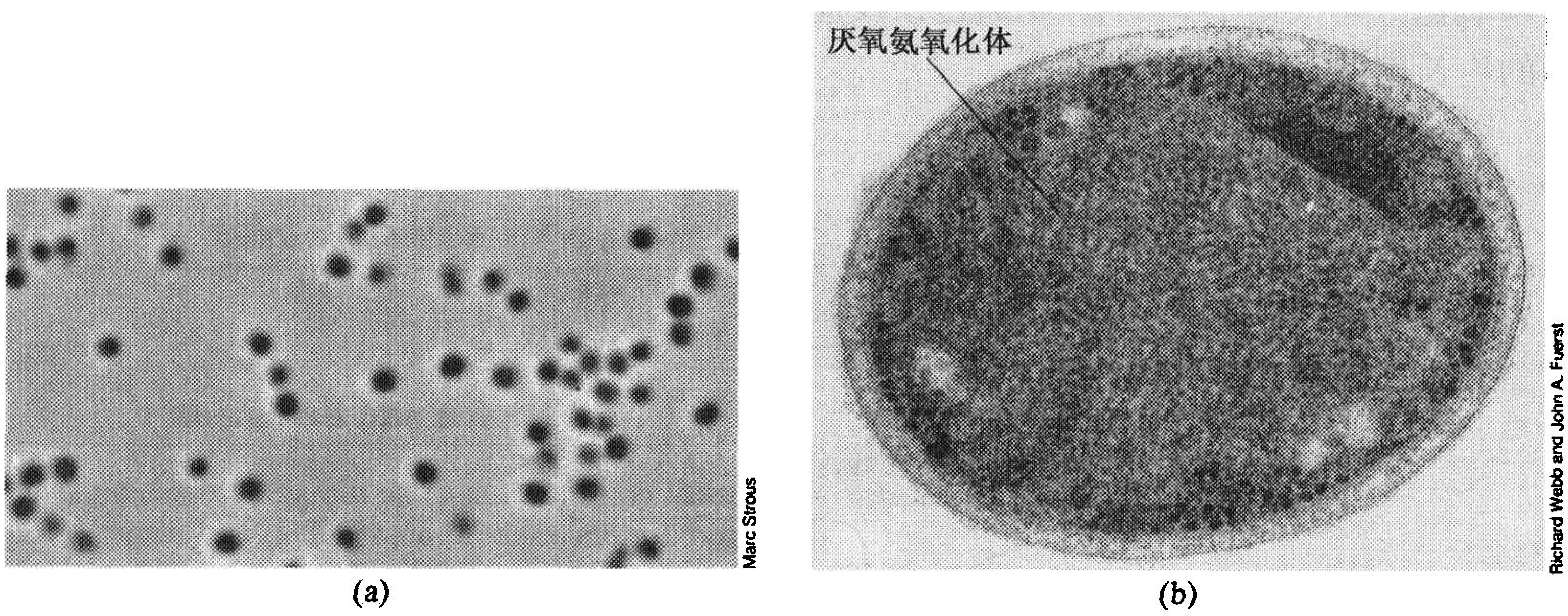


图 17.34 厌氧氨氧化布罗卡德氏菌。 (a) 相差显微照片。单个细胞直径约 1μm。(b) 一个细胞的透射电镜图。注意被膜包裹的组分，包括在细胞中部的巨大的纤丝状厌氧氨氧化体（箭头）。布罗卡德氏菌在系统发育上属于浮霉状菌属（*Planctomyces*），浮霉状菌在细胞质中含有几种不同类型的被膜包裹的组分（见 12.28 节和图 12.87）。

厌氧氨氧化体是一个单位膜结构，换句话说，是一种细胞器（organelle）（图 17.34b）。但是，布罗卡德氏菌显然是一种原核生物。除了前面所提到的“细胞核”外，厌氧氨氧化体是另一种类型的被膜包裹的组分。厌氧氨氧化体膜的脂类也是独特的，是由含有多个环丁烷环（图 11.24）的脂肪酸组成，通过酯键和醚键与甘油相连接。脂类聚集形成一种非常致密的膜结构，抗扩散性极强。这种坚固的厌氧氨氧化体膜可能是为了防止细胞受到厌氧氨氧化反应中产生的毒性中间产物的危害。

厌氧氨氧化反应中所需的 NO_2^- 由好氧硝化细菌氧化氨产生（图 17.32）。两类硝化菌，好氧的（如亚硝化单胞菌）和厌氧的（如布罗卡德氏菌）共同生活于富氨的生境（如污水和其他废水中）。在这些环境中，存在着既含有有氧区又含有无氧区的悬浮颗粒，在那里两类氨氧化菌可以共存。在实验室中混合培养时，高浓度的氧抑制厌氧氨氧化反应，促进典型的硝化作用。因此，在自然界中，有可能厌氧氨氧化反应所介导的氨

的氧化程度是受系统中氧浓度的控制。

与标准的硝化细菌相似，厌氧氨氧化布罗卡德氏菌也是一种自养生物。厌氧氨氧化生物能够以 CO_2 为唯一碳源生长，并利用亚硝酸盐为电子供体产生细胞物质：

$$CO_2 + 2NO_2^- + H_2O \rightarrow CH_2O + 2NO_3^-$$

虽然厌氧氨氧化布罗卡德氏菌是一种自养硝化菌，但是它似乎缺少卡尔文循环酶，固定 CO_2 的机制不明确。尽管如此，厌氧氨氧化布罗卡德氏菌所进行的以亚硝酸盐为电子供体固定 CO_2 并产生硝酸盐的反应，与好氧硝化菌如硝化杆菌所进行的反应完全相同（图 17.33）。因此，尽管在系统发育上截然不同，好氧硝化菌与厌氧氨氧化生物拥有共同的底物和生态环境。

在厌氧氨氧化被了解之前，氨被认为在无氧环境中是稳定的，但是现在已经清楚氨在无氧条件下能够被氧化。从环境的观点来看，厌氧氨氧化在无氧废水处理中是一种非常有益的反应，氨和相关胺类的去除有助于降低江河的固定氮污染，从而保持高质量的水质。厌氧氨氧化的生态学研究表明，该反应也发生在海洋沉积物中，由类似于布罗卡德氏菌的生物进行。这个发现有助于解释海洋环境中相当一部分氨丢失的原因，而该原因目前从机制上尚未清楚。

概念检查

在硝化细菌中氨和亚硝酸盐可以作为电子供体，氨氧化细菌产生亚硝酸盐，亚硝酸盐再被亚硝酸盐氧化细菌氧化成硝酸盐，在厌氧氨氧化体中，无氧 NH_3 氧化反应与 N_2 和 NO_3^- 的产生相偶联。

- 亚硝化单胞菌的无机电子供体是什么？硝化杆菌的呢？
- 氨单加氧酶的底物是什么？
- 硝化细菌使用的碳源是什么？
- 什么是厌氧氨氧化反应？与有氧的硝化反应如何区分？

Ⅲ　生命的厌氧途径：厌氧呼吸

在真核生物中，罕见厌氧生长；相反，在原核生物中，厌氧生长却普遍存在，并且厌氧代谢的机制极不相同。在下面几节中，我们将对厌氧呼吸（anaerobic respiration）进行评述，了解原核生物利用非 O_2 电子受体储存能量的多种方式。

17.13　厌氧呼吸

在第 5 章中我们已经相当详细地讨论了有氧呼吸的过程，从中得知，氧分子作为终端电子受体，通过电子传递链接受来自电子载体的电子。不过我们也指出，有许多其他的电子受体可被用来代替 O_2，在这种情况下该过程称为厌氧呼吸。现在我们来讨论一些有关厌氧呼吸的反应过程。

进行厌氧呼吸的细菌具备由细胞色素、醌、铁硫蛋白以及其他典型的电子传递蛋白

组成的电子传递系统，因此它们的呼吸系统与常规的好氧菌的类似。在某些情况下，如在反硝化细菌中，厌氧呼吸过程与有氧呼吸相互竞争。在这种情况下，如果有 O_2存在，则有氧呼吸占优势；当环境中氧气被消耗时，替补的电子受体被还原。其他进行厌氧呼吸的微生物是专性厌氧菌，不能利用 O_2。

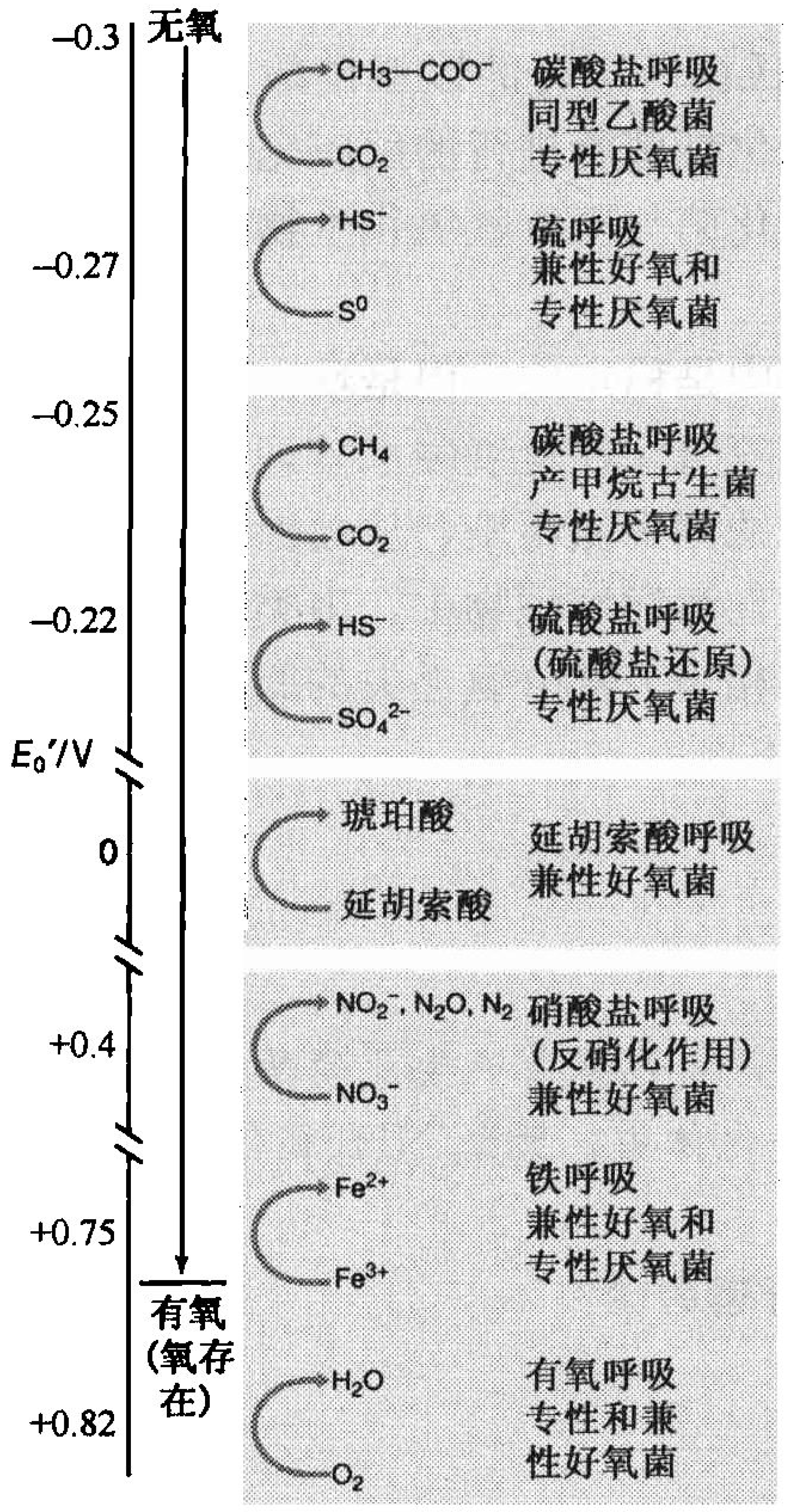


图 17.35 厌氧呼吸的类型。电偶联按一定顺序排列，由负电性最强的 E_0'（上）到正电性最强的 E_0'（下）。与图 5.9 比较，看看这些厌氧呼吸所释放的能量是如何不同的。

替补的电子受体和电子塔

电子供体被氧化时，利用 O_2作为电子受体所释放出的能量高于利用替补的电子受体（图 5.9）。如果考察一下每种受体的还原电位，能量的差别是显而易见的（图 17.35）。因为 O_2/H_2O 电偶联的还原电位的正电性最强，所以当 O_2被利用时所产生的能量高于其他的电子受体。靠近 O_2/H_2O 的其他电子受体为 Fe^{3+}、NO_3^-和 NO_2^-，负电性较高的受体是 SO_4^{2-}、S^0和 CO_2。最常见的厌氧呼吸类型总结于图 17.35。

同化代谢和异化代谢

许多微生物可以将 NO_3^-、SO_4^{2-}和 CO_2等无机化合物还原，分别作为细胞的氮源、硫源和碳源，还原反应的最终产物分别主要是氨基（—NH_2）、巯基（—SH）和有机碳化合物。当 NO_3^-、SO_4^{2-}和 CO_2等无机化合物被还原用于生物合成时，称为被同化，其还原过程叫做同化代谢（assimilative metabolism）。从概念上来说，NO_3^-、SO_4^{2-}和 CO_2的同化代谢与它们在厌氧呼吸中作为电子受体完全不同。为了区别这两种还原过程，这些化合物作为电子受体进行的能量代谢被称为异化代谢（dissimilative metabolism）。

同化代谢和异化代谢有显著差别。在同化代谢中，只有刚好够量的化合物（NO_3^-、SO_4^{2-}或 CO_2）被还原以满足细胞生长的需要，产物最终以大分子的形式转化成细胞物质。在异化代谢中，大量的电子受体被还原，并且还原产物被分泌到环境中。许多生物进行 NO_3^-、SO_4^{2-}和 CO_2等化合物的同化作用（如许多细菌、古生菌、真菌、藻类以及高等植物），只有有限的生物，主要是原核生物，进行异化作用。

概念检查

虽然在产能代谢中 O_2是最广泛使用的电子受体，但许多其他的化合物也能够被用

作电子受体。厌氧呼吸过程产能效率较低，但是它却使无氧环境中进行呼吸成为可能。

◆ 什么是厌氧呼吸？

◆ 当 H_2作为电子供体时，为什么 NO_3^- 的还原反应比 S^0的还原反应更容易进行？

17.14 硝酸盐还原和反硝化作用

无机氮化合物是厌氧呼吸中最常见的一些电子受体，表 17.2 列出了几种无机氮化合物以及它们的氧化态。自然界中分布最广的无机氮化合物是氨和硝酸盐，它们均是在大气中通过无机化学反应形成，氮气也是如此，它是自然界中氮的最稳定的形式。我们将在本章的后部分（见 17.28 节）讨论固氮作用（nitrogen fixation），即以 N_2作为生物合成的氮源。

表 17.2 主要氮化合物的氧化态

化合物	氧化态	化合物	氧化态
有机氮（R—NH_2）	−3	一氧化氮（NO）	+2
氨（NH_3）	−3	亚硝酸盐（NO_2^-）	+3
氮气（N_2）	0	二氧化氮（NO_2）	+4
一氧化二氮（N_2O）	+1（平均每个 N）	硝酸盐（NO_3^-）	+5

硝酸盐，NO_3^-，是最常见的替换电子受体之一，被还原成 N_2O、NO 和 N_2。由于这些硝酸盐还原的产物都是气体，容易从环境中去除，因此该过程被称为反硝化作用（denitrification）（图 17.36）。反硝化作用是由生物形成 N_2气的主要途径，与硝酸盐相比，N_2作为氮源更不易为生物体所利用，因此至少在农业上来说反硝化作用是一个有害的过程。然而对于污水处理而言（见 28.2 节），反硝化作用是一个有益的过程，因为它可以将 NO_3^- 转化为 N_2，从而有效地降低污水处理排出物中能够刺激藻类生长的固定态氮的负荷（见 19.5 节）。

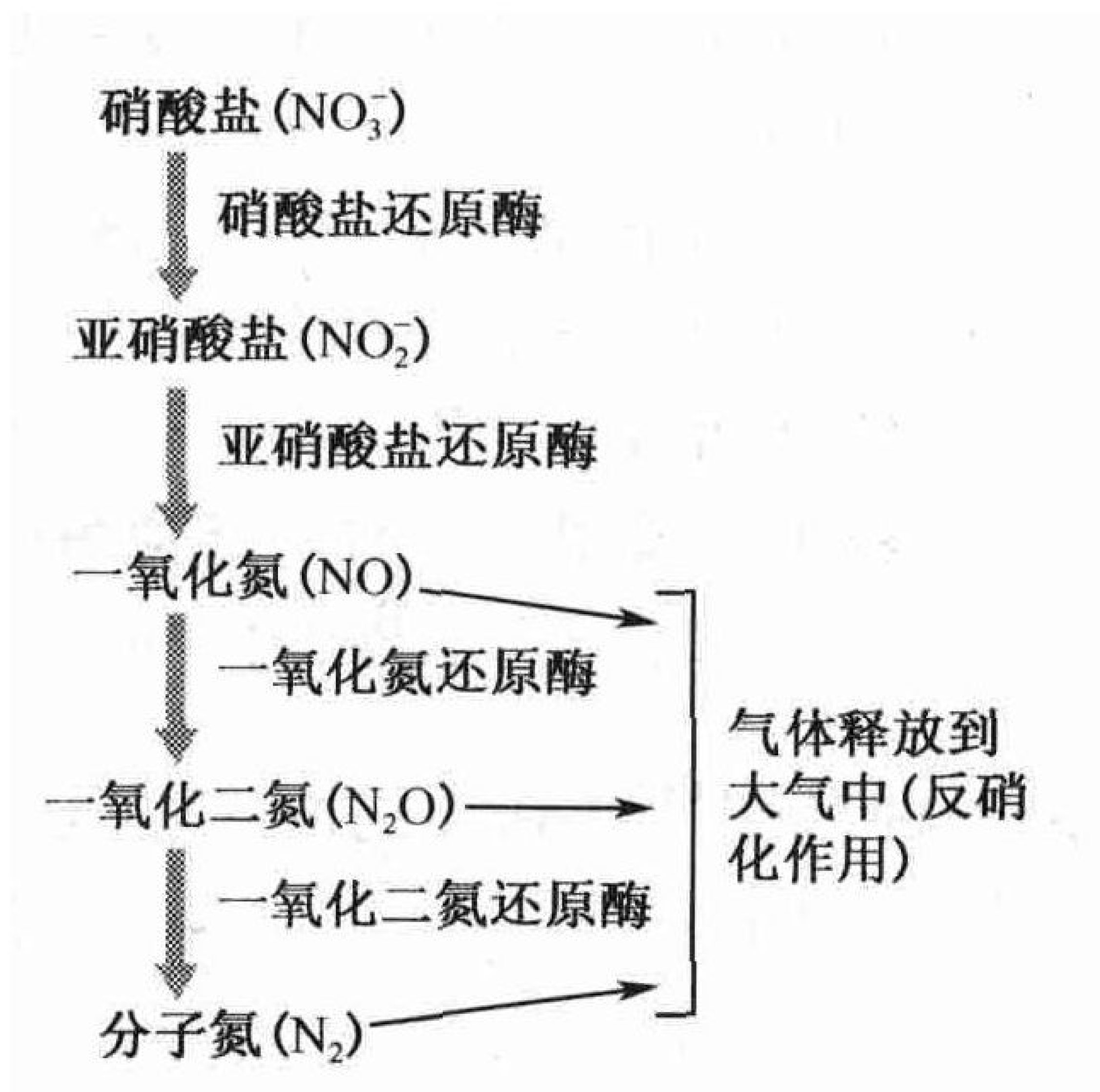


图 17.36 硝酸盐异化还原的步骤。 一些生物，如大肠杆菌（*Escherichia coli*），只能进行第一步反应。涉及的所有酶在无氧条件下解除阻遏。此外，还发现一些原核生物能够在异化作用中将 NO_3^- 还原成 NH_4^+。

异化硝酸盐还原的生物化学

异化硝酸盐还原反应中第一步所涉及的酶，即硝酸盐还原酶，是一种含钼的膜结合酶，其合成受到分子氧的阻遏。途径中随后的所有酶（图 17.37）均受到协同调节，因此也被氧阻遏，但是除了无氧条件外，在这些酶完全表达前还必须有硝酸盐存在。

硝酸盐还原反应的第一个产物是亚硝酸盐（NO_2^-），亚硝酸盐还原酶将其还原成一氧化氮（NO）（图 17.37c）。一些生物能够在异化过程中将 NO_2^- 还原成氨（NH_3），但是从整体上来看，产生气态的产物（反硝化作用）更有意义。这是因为反硝化作用消耗

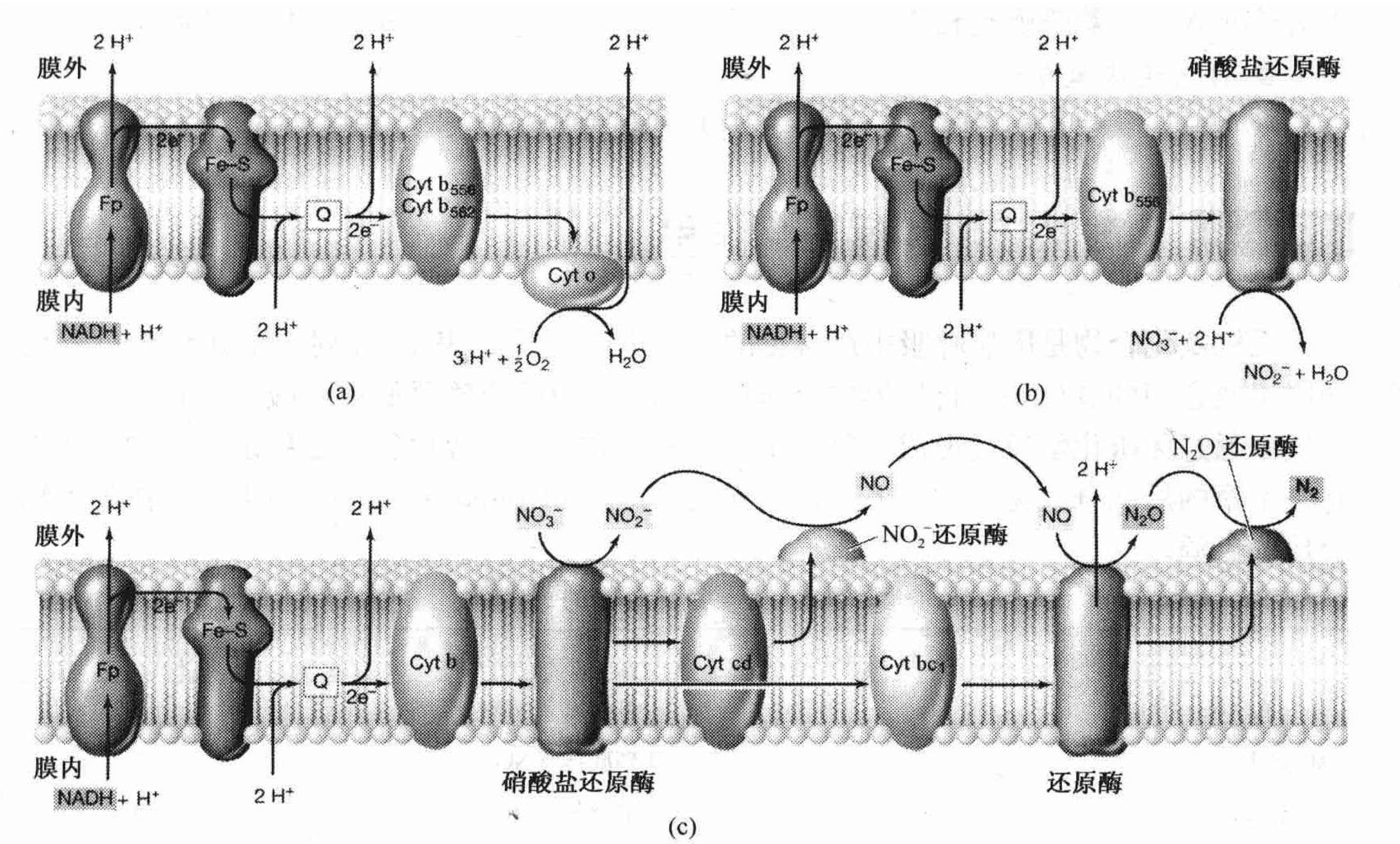


图 17.37 呼吸作用。当（a）O_2或（b）NO_3^-作为电子受体，NADH 作为电子供体时大肠杆菌（*Escherichia coli*）膜内的电子传递过程。Fp：黄素蛋白；Q：醌。当O_2浓度高时，电子载体依次为 Cyt b_{562}→Cyt o → O_2；但当O_2浓度低时（未显示），电子载体依次为 Cyt b_{568}→ Cyt d → O_2。注意，在电子传递反应过程中，每 2 个电子被有氧氧化时所转移的质子数是如何多于以硝酸盐作为电子受体无氧氧化时所转移的质子数的，因为有氧的终端氧化酶（Cyt o）能够泵出 1 个质子。（c）施氏假单胞菌（*Pseudomonas stutzeri*）在反硝化过程中膜内可能存在的电子传递机理。硝酸盐还原酶和一氧化氮（NO）还原酶位于细胞质膜内，而亚硝酸盐（NO_2^-）还原酶和一氧化二氮（N_2O)还原酶位于细胞周质中。除了硝酸盐还原酶外，各种还原酶的中间电子供体尚未确定。

掉一种易被植物利用的固定形式的氮（NO_3^-），产生气态的氮化合物，其中有一些具有环境上的重要性。例如，N_2O可被阳光转化成 NO，NO 与大气层上部的臭氧反应形成亚硝酸盐（NO_2^-），亚硝酸盐则以酸雨（亚硝酸，HNO_2）的形式返回地球。反硝化作用的其余生化步骤见图 17.37c。

几种生物中异化硝酸盐还原的生物化学已被详细研究。在大肠杆菌中，NO_3^-只被还原成NO_2^-（图 17.37b)，而在脱氮副球菌（*Paracoccus denitrificans*）和施氏假单胞菌中，可以发生真正的反硝化反应（图 17.37c)。大肠杆菌的硝酸盐还原酶接受来自 1 个 b 型细胞色素的电子，其有氧呼吸电子传递链与无氧呼吸电子传递链的比较见图 17.37a 和 17.37b。从中可以看出，受NO_3^-/NO_2^-电偶联的还原电位（+0.43V）所限，在硝酸盐还原过程中只产生 2 个质子移位反应，而在有氧呼吸中$\left(\frac{1}{2}O_2/H_2O，+0.82V\right)$能产生 3 个质子移位反应。在脱氮副球菌和施氏假单胞菌中，亚硝酸盐被亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶和一氧化二氮还原酶催化，形成氧化氮（图 17.37c)。在电子传递过程中，建立了一个质子动力，并在 ATPase 的催化下以常规方式产生 ATP。当NO_3^-被还原成N_2

时，会产生额外的 ATP，因为 NO 还原酶与质子的排出相关联（图 17.37c）。

反硝化原核生物的其他性质

多数反硝化原核生物在系统发育上属于变形菌门（Proteobacteria）（见 12.2 节～12.18 节），并且是兼性好氧菌。当空气存在时，即使是培养基中有硝酸盐也进行有氧呼吸。许多反硝化细菌也会厌氧还原其他的电子受体，如三价铁（Fe^{3+}）和某种有机电子受体（见 17.18 节）。此外，许多反硝化细菌还能够进行发酵生长。因此，从产能机制的选择上来看，反硝化细菌在代谢上变化繁多。

概念检查

硝酸盐是厌氧呼吸中一种常用的电子受体，利用硝酸盐需要有硝酸盐还原酶，硝酸盐还原酶可以将硝酸盐还原成亚硝酸盐。许多在厌氧呼吸中使用硝酸盐的细菌最终产生 N_2，该过程称为反硝化作用。

◆ 对大肠杆菌而言，为什么有氧呼吸所释放的能量比 NO_3^- 还原过程所释放的能量多？

◆ 在细胞中的什么部位可以发现异化硝酸盐还原酶？它含有的不常见的金属是什么？

◆ 为什么施氏假单胞菌比大肠杆菌从 NO_3^- 呼吸中得到的能量更多？

17.15 硫酸盐还原

有几种无机硫化合物是厌氧呼吸中重要的电子受体，表 17.3 列出了主要硫化合物的氧化态（化合价）。硫的最高氧化形式是硫酸盐，硫酸盐是海水中一种主要的阴离子，可以被在自然界中广泛存在的硫酸盐还原菌（sulfate-reducing bacteria）所利用。硫酸盐还原的终产物是 H_2S，这是一种重要的天然产物，可以参与许多生物地球化学的反应（见 19.13 节）。

同氮一样，在硫酸盐还原中重要之处在于区分同化作用和异化作用。许多生物，包括高等植物、藻类、真菌以及大多数原核生物，将硫酸盐作为硫源用于生物合成。但是只有硫酸盐还原菌能够以硫酸盐作为电子受体用于产能，该过程大量还原 SO_4^{2-}。在同化硫酸盐还原过程中，生成的 H_2S 马上便被转化成氨基酸等形式的有机硫，但是在异化硫酸盐还原中 H_2S 则被分泌出去。

从表 A1.2 和图 17.35 所示的还原电位可知，与 O_2 或 NO_3^- 相比，硫酸盐是一种比较差的电子受体，然而当一种能够产生 NADH 或 FADH 的电子供体被利用时，便能释放足够多的能量用于合成 ATP。由于 SO_4^{2-} 可被利用的能量较少，有机体在 SO_4^{2-} 上生长时的生长产率低于在 O_2 或 NO_3^- 上生长时的生长产率。表 17.3 列出了一些能够被硫酸盐还原菌所利用的电子供体。H_2、乳酸和丙酮酸，可以被许多种硫酸盐还原菌所利用，而其他的电子供体在使用上受到限制。硫酸盐还原菌的许多形态和生理类型已经被

了解（见 12.18 节和 13.17 节），除了一种古生球菌 *Archaeoglobus* 外，所有已知的硫酸盐还原原核生物均为细菌。

表 17.3 用于硫酸盐还原的硫化合物和电子供体

化合物	氧化态	化合物	氧化态
主要硫化合物的氧化态		**用于硫酸盐还原的一些电子供体**	
有机硫（R—SH）	−2	H_2	乙酸
硫化物（H_2S）	−2	乳酸	丙酸
元素硫（S^0）	0	丙酮酸	丁酸
硫代硫酸盐（$S_2O_3^{2-}$）	+2（平均每个 S）	乙醇和其他醇类	长链脂肪酸
二氧化硫（SO_2）	+4	延胡索酸	苯甲酸
亚硫酸盐（SO_3^{2-}）	+4	苹果酸	吲哚
硫酸盐（SO_4^{2-}）	+6	胆碱	十六烷

硫酸盐还原的生物化学和能量学

从 SO_4^{2-} 到 H_2S 是一个 8 个电子的还原反应（表 17.3），历经一系列中间步骤。硫酸根离子很稳定，若事先不被激活就不能被还原。ATP 可激活硫酸盐，ATP 硫酸化酶（ATP sulfurylase）催化硫酸根离子结合到 ATP 的磷酸酯上，进而形成腺苷磷酰硫酸（APS）（图 17.38）。在异化硫酸盐还原中，APS 的硫酸根在 APS 还原酶的作用下被直

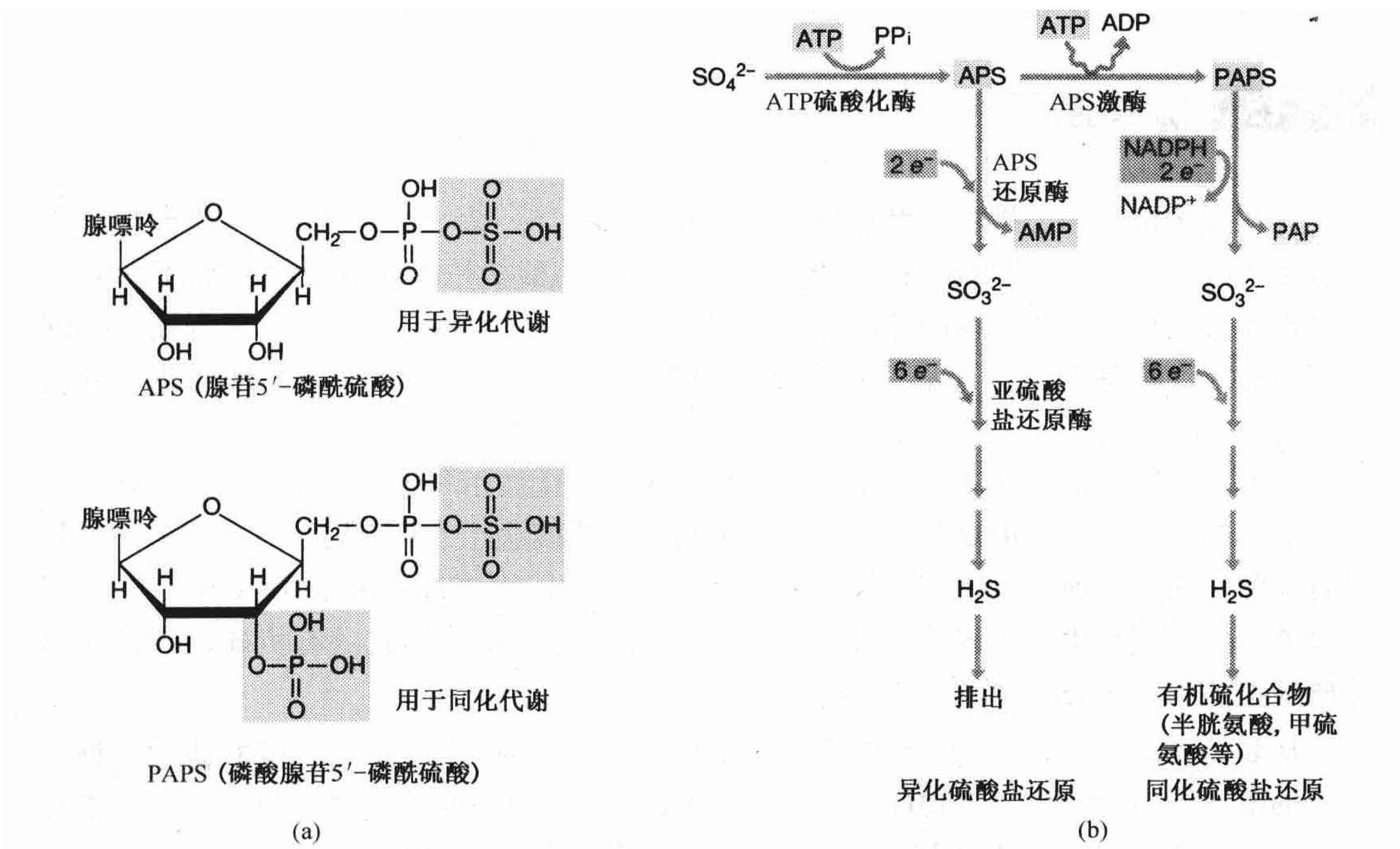


图 17.38 硫酸盐还原的生物化学。（a）可产生两种形式的活性硫酸盐：腺苷 5′-磷酰硫酸（APS）和磷酸腺苷 5′-磷酰硫酸（PAPS）。两者均是二磷酸腺苷（ADP）的衍生物，由 ADP 的第二个磷酸被硫酸替代而得。（b）同化硫酸盐还原和异化硫酸盐还原的示意图。

接还原成亚硫酸盐（SO_3^{2-}），并释放出 AMP。在同化还原中，APS 上添加了另外一个 P 形成磷酸腺苷磷酰硫酸（phosphoadenosine phosphosulfate，PAPS）（图 17.38a），然后硫酸根才被还原。在上述两种情况下，硫酸盐还原的第一个产物均是亚硫酸盐 SO_3^{2-}，一旦形成了 SO_3^{2-}，便可以在亚硫酸盐还原酶的作用下形成硫化物（图 17.38b）。

在异化硫酸盐还原过程中，发生电子传递反应，从而形成质子动力，质子动力在 ATPase 的催化下驱动 ATP 的合成。一个主要的电子载体是细胞色素 c_3，这是一种低电位的周质细胞色素（图 17.39）。细胞色素 c_3 接受来自位于周质的氢化酶的电子后，将电子传递给一个膜结合的蛋白复合物，这种被称为 Hmc 的复合物再携带电子跨过细胞质膜，从而使电子可以被 APS 还原酶和亚硫酸盐还原酶这两种细胞质内的酶所利用（图 17.39）。

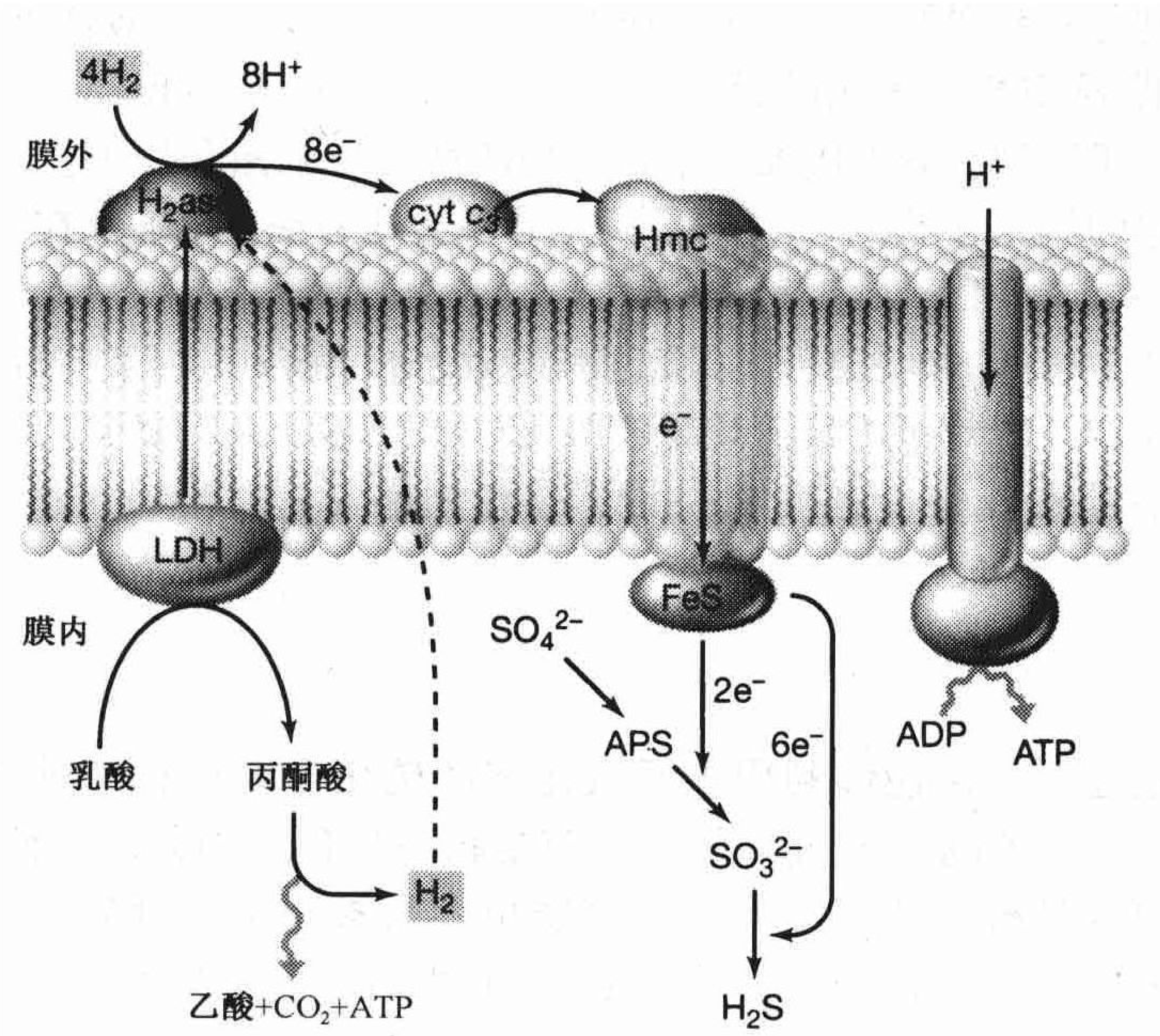


图 17.39　硫酸盐还原细菌中的电子传递和能量保存。除了外源氢（H_2）之外，来自有机化合物如乳酸和丙酮酸分解代谢的 H_2 也可以供氢化酶使用。氢化酶（H_2ase）、细胞色素 c_3 和细胞色素复合物（Hmc）为周质蛋白。一个独立的蛋白质将电子从 Hmc 穿过细胞质膜传递给细胞质内的铁硫蛋白，为 APS 还原酶和亚硫酸盐还原酶提供电子（分别形成 SO_3^{2-} 和 H_2S，图 17.38b）。LDH：乳酸脱氢酶。

不管生物体［如脱硫弧菌（*Desulfovibrio*）］是利用 H_2 本身生长，还是在一种有机化合物（如乳酸）上生长，氢化酶在硫酸盐还原中均起着重要作用。这是因为乳酸可通过丙酮酸转化成乙酸（乙酸主要被分泌排出，因为脱硫弧菌是一种非乙酸氧化型的硫酸盐还原菌，见 12.18 节），同时产生 H_2。产生的 H_2 跨过细胞质膜被周质氢化酶氧化，产生 1 个质子动力（图 17.39）。由硫酸盐还原细菌的生长量可知，每一个 SO_4^{2-} 被还原成 HS^-，可以产生 1 个 ATP，加上 H_2 之后反应式为：

$$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$$
$$\Delta G^{0\prime} = -152\text{kJ}$$

当乳酸或丙酮酸为电子供体时，不仅通过质子动力产生 ATP，还可以在丙酮酸经过乙酰-CoA 和乙酰磷酸氧化成乙酸和 CO_2 的过程中，产生额外的 ATP（进一步的讨论见 17.19 节）。

乙酸利用和自养作用

许多硫酸盐还原菌能够将乙酸完全氧化成 CO_2 作为硫酸盐还原的电子供体（见 12.18 节）：

$$CH_3COO^- + SO_4^{2-} + 3H^+ \rightarrow 2CO_2 + H_2S + 2H_2O \quad \Delta G^{0\prime} = -57.5kJ$$

尽管该过程的能量学不如 H_2 或乳酸代谢的能量学了解得那么透彻，但是乙酸氧化的机制已经清楚。除了极个别情况外，乙酸通过乙酰-CoA 途径（acetyl-CoA pathway）被氧化成 CO_2，这是一系列的可逆反应，众多的厌氧菌将其用于乙酸合成或乙酸氧化（见 17.16 节）。该路径需要一氧化碳脱氢酶（carbon monoxide dehydrogenase）这一关键酶，它首先发现于同型乙酸生成细菌中，同型乙酸生成细菌利用 $H_2 + CO_2$ 产生乙酸作为一种能量保存的机制（见 17.16 节）。少数硫酸盐还原细菌也能够在一种含有 H_2（作为电子供体）、SO_4^{2-}（作为电子受体）和 CO_2（作为碳源）的缺氧的矿物盐培养基上自养生长。当在这些条件下生长时，自养型的硫酸盐还原菌利用乙酰-CoA 途径产生细胞物质。乙酸氧化型的硫酸盐还原细菌脱硫菌（*Desulfobacter*）缺少乙酰-CoA 途径中的酶，因此通过柠檬酸循环途径（图 5.22）氧化乙酸，但这似乎只是个特例，而不是规律。

硫歧化反应

某种硫酸盐还原细菌能够利用中间氧化态的硫化合物进行一种被称为歧化反应（disproportionation）的能量代谢。歧化反应是指一种化合物分解为两种新的化合物，一种比原底物更容易被氧化，一种比原底物更容易被还原。例如，硫歧化脱硫弧菌（*Desulfovibrio sulfodismutans*）能够歧化硫代硫酸盐，反应如下：

$$S_2O_3^{2-} + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + H_2S$$
$$\Delta G^{0\prime} = -21.9kJ/反应$$

注意 $S_2O_3^{2-}$ 中的一个硫原子被氧化（形成 SO_4^{2-}），而另一个硫原子被还原（形成 H_2S）。硫歧化脱硫弧菌将硫代硫酸盐氧化后，形成 1 个质子动力，用于生产 ATP。其他的还原态硫化合物，如亚硫酸盐（SO_3^{2-}）和硫（S^0）也能够被某种硫酸盐还原菌歧化。这种形式的代谢使硫酸盐还原细菌能够从自然界中与其共存的硫化能无机营养生物（见 19.13 节）氧化 H_2S 所产生的中间体硫化合物中回收能量。

亚磷酸盐氧化

至少一种硫酸盐还原细菌能够将亚磷酸盐的氧化与硫酸盐还原相耦合，该反应属于化能无机营养型，产物是磷酸盐和硫化物：

$$4HPO_3^- + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow 4HPO_4^{2-} + HS^-$$
$$\Delta G^{0\prime} = -364kJ$$

所述的生物，即 *Desulfotignum phosphitoxidans*，仅需要 CO_2 就可以满足碳的需求（因此它是一种自养生物）。这是一种严格厌氧菌，并且也必须是严格厌氧菌，因为亚磷酸盐在空气中会自发氧化。自然界中亚磷酸盐的来源尚不清楚，但是既然 *D. phosphitoxidans* 能够以亚磷酸盐为唯一能源，那么亚磷酸盐似乎是在无氧环境中产生的，可能来自有机磷酸盐的降解。亚磷酸盐氧化与硫歧化反应（也是一种化能无机营养过程）和 H_2 利用一起丰富了硫酸盐还原细菌化能无机营养的多样性。

概念检查

硫酸盐还原细菌将硫酸盐还原成硫化氢。硫酸盐被还原前首先需要 1 个 ATP 参与的反应被活化，形成腺苷磷酰硫酸（APS）。用于硫酸盐还原的电子供体包括 H_2、有机化合物，甚至是亚磷酸盐。对硫酸盐还原细菌中的某些菌来说，硫化合物的歧化反应是另外一种产能策略。

- 鉴别下列符号：S^0、SO_4^{2-}、SO_3^{2-}、$S_2O_3^{2-}$、H_2S。
- 在异化硫酸盐还原过程中硫酸盐是如何转化成亚硫酸盐的？
- 对硫酸盐还原细菌来说，H_2 为什么重要？
- 列举一个歧化反应的例子。

17.16 乙酸生成作用

CO_2 在自然界中很常见，并且通常在无氧生境中含量丰富，因为 CO_2 是化能有机营养生物能量代谢的主要产物。有两大类严格厌氧的原核生物能够在能量代谢中以 CO_2 为电子受体，即同型产乙酸菌（homoacetogen）和产甲烷菌（methanogen）。氢是这两类生物的主要电子供体，产甲烷作用和乙酸生成作用的一般过程见图 17.40。两种过程均会产生 H^+ 或 Na^+ 离子梯度，为膜内的 ATPase 提供动力。乙酸生成作用还通过底物水平磷酸化参与能量的贮存。

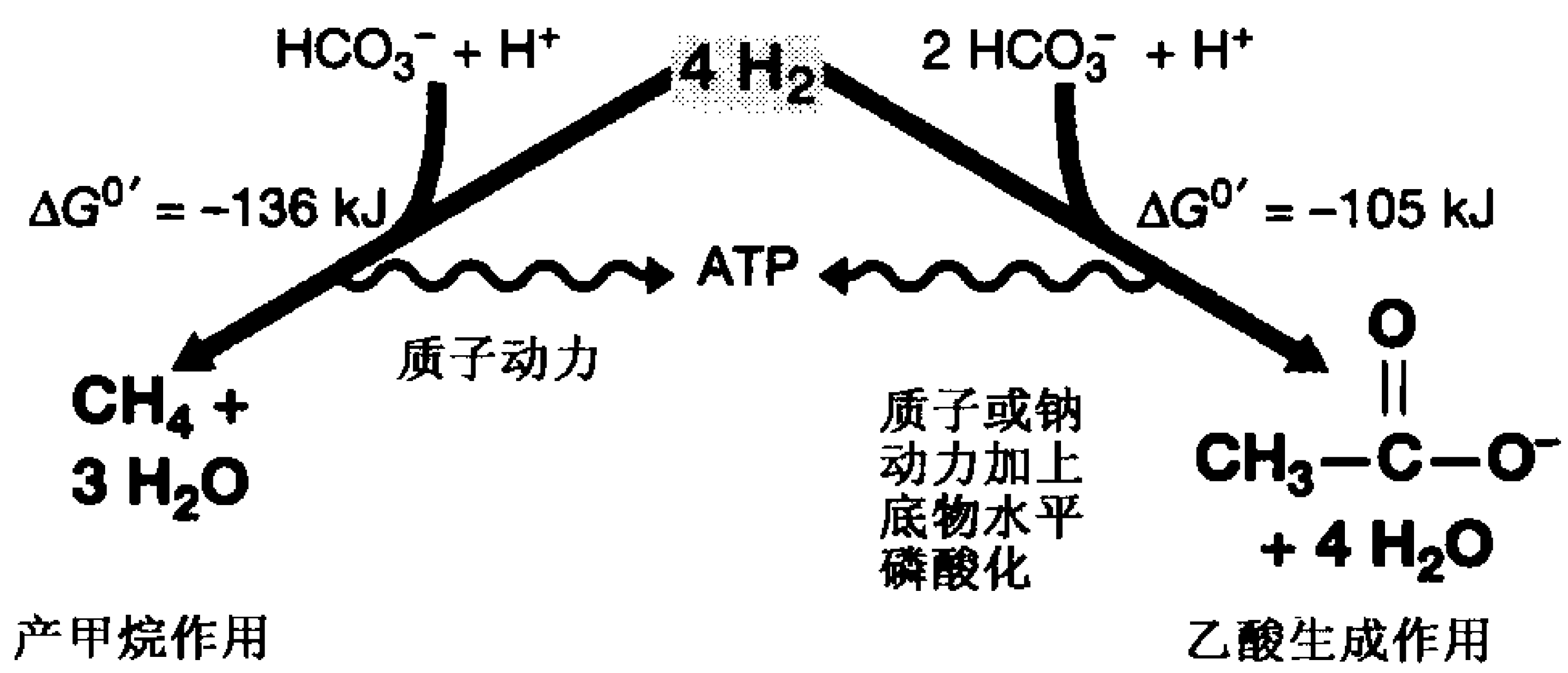


图 17.40　产甲烷作用和乙酸生成作用的过程比较。注意反应中释放的自由能的差别。

生物和途径

同型产乙酸菌能够进行下述反应：

$$4H_2 + H^+ + 2HCO_3^- \longrightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$$

除了 H_2以外，用于乙酸生成作用的电子供体还包括许多 C_1化合物、糖类、有机酸、氨基酸、醇类以及某种含氮碱基，取决于生物体，许多同型产乙酸菌还能够还原 NO_3^- 和 $S_2O_3^{2-}$ 。然而 CO_2还原可能是具有生态意义的主要反应。

同型产乙酸菌中最一致的路线是 CO_2还原的途径。同型产乙酸菌通过乙酰-CoA 途径将 CO_2转变成乙酸，并且许多同型产乙酸菌还利用该途径进行自养生长。表 17.4 列出了产生乙酸或通过乙酰-CoA 途径氧化乙酸的主要生物。像伍氏醋酸杆菌（*Acetobacterium woodii*）和醋酸梭菌（*Clostridium aceticum*）等生物既能够通过发酵糖类（反应 1）进行化能有机营养生长，又能通过以 H_2为电子供体（反应 2）将 CO_2还原为乙酸进行化能无机营养生长，每种情况下主要的产物均为乙酸：

（1）$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+$

（2）$2HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$

同型产乙酸菌通过糖酵解途径发酵葡萄糖，将葡萄糖转化成 2 分子的丙酮酸和 2 分子的 NADH（4 当量 H），之后产生 2 分子的乙酸：

（3）2 丙酮酸根$^-$ → 2 乙酸根$^-$ + $2CO_2$ + 4H

利用糖酵解产生的 4 个电子加上 2 分子丙酮酸氧化成 2 分子乙酸所产生的 4 个电子（反应 3）将反应（3）产生的 2 分子 CO_2还原后生成同型乙酸发酵的第三个乙酸。因此从丙酮酸开始，产生的总乙酸可写成：

$$2\ 丙酮酸根^- + 4H \rightarrow 3\ 乙酸根^- + H^+$$

表 17.4 利用乙酰-CoA 途径固定 CO_2 的生物

Ⅰ. 乙酸合成，能量代谢的结果
潮湿厌氧醋菌（*Acetoanaerobium noterae*）
伍氏醋酸杆菌（*Acetobacterium woodii*）
威氏醋酸杆菌（*Acetobacterium wieringae*）
凯伍产醋菌（*Acetogenium kivui*）
瘤胃聚乙酸菌（*Acetitomaculum ruminis*）
醋酸梭菌（*Clostridium aceticum*）
热醋梭菌（*Clostridium thermaceticum*）
蚁酸醋酸梭菌（*Clostridium formicaceticum*）
东方脱硫肠状菌（*Desulfotomaculum orientis*）
少食鼠孢菌（*Sporomusa paucivorans*）
黏液真杆菌（*Eubacterium limosum*）（也产生丁酸）
密螺旋体（*Treponema primitia*）（来自白蚁的后肠）
Ⅱ. 自养代谢中乙酸合成
自养同型产乙酸菌
自养产甲烷菌
自养硫酸盐还原菌
Ⅲ. 能量代谢中乙酸氧化
反应：乙酸 + $2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 8H$
第Ⅱ类硫酸盐还原菌（不是脱硫菌）
反应：乙酸 → $CO_2 + CH_4$
乙酸营养产甲烷菌［甲烷八叠球菌（*Methanosarcina*），鬃毛甲烷菌（*Methanosaeta*）］

大部分在能量代谢中产生并分泌乙酸的同型产乙酸菌是革兰氏阳性菌，并且许多属于梭菌属（*Clostridium*）。少数其他的革兰氏阳性菌和许多革兰氏阴性菌是利用乙酰-CoA途径进行自养，将 CO_2 还原成乙酸来为细胞提供碳。

对某些硫酸盐还原细菌来说，乙酰-CoA 途径在自养生长中起作用（见 12.18 节和 19.13 节）。产甲烷菌也利用乙酰-CoA 途径，其中多数产甲烷菌能够在 H_2+CO_2 上自养生长（见 13.4 节、17.17 节和 19.10 节）。相反，某些细菌主要利用乙酰-CoA 途径的反向反应来将乙酸氧化为 CO_2，其中包括乙酸营养产甲烷菌（见 13.4 节）和硫酸盐还原细菌（见 12.18 节）。

乙酰-CoA 途径的反应

与卡尔文循环（见 17.6 节）或反向柠檬酸循环或羟丙酸循环（见 17.7 节）等自养途径不同，用于固定 CO_2 的乙酰-CoA 途径并不是一个环路途径，而是通过两条线性的路径将 CO_2 还原——一个 CO_2 分子被还原成乙酸的甲基，另一个 CO_2 分子被还原成羰基，最后它们被组装形成乙酰-CoA（图 17.41）。

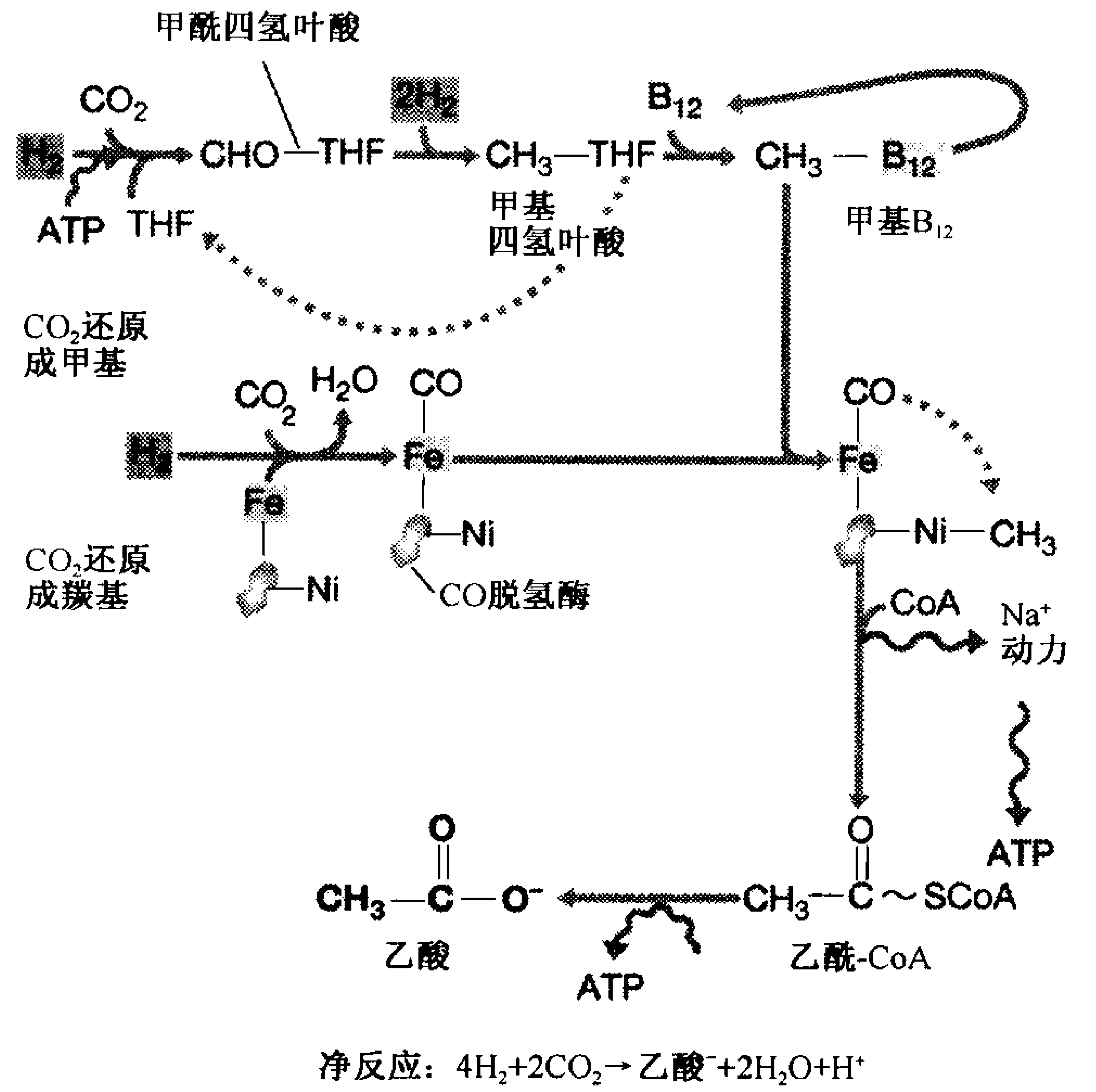


图 17.41　乙酰-CoA 途径的反应。THF：四氢叶酸；B_{12}：与酶结合的中间体中的维生素 B_{12}。在一氧化碳脱氢酶作用下 CO 与一个 Fe 原子结合，CH_3 基团与 CO 脱氢酶中一个有机镍化合物中的镍原子结合。注意，乙酰-CoA 的形成是如何为 Na^+ 泵提供动力驱动 ATP 合成的，并且在乙酰-CoA 转化成乙酸的过程中同样会产生 ATP。

乙酰-CoA 途径中的一个关键酶是一氧化碳脱氢酶。一氧化碳脱氢酶是一种以金属 Ni、Zn 和 Fe 为辅助因子的复合酶，催化下述反应：

$$CO_2 + H_2 \rightarrow CO + H_2O$$

产生的CO构成乙酸的羰基（图17.41）。乙酸的甲基由一系列涉及辅酶四氢叶酸（tetrahydrofolate）的反应将CO_2还原而产生（图17.41），然后，形成的甲基从四氢叶酸转移给一种以维生素B_{12}为辅助因子的酶（图17.41），在途径的最后一步，CH_3基团与一氧化碳脱氢酶中的CO结合形成乙酸。有趣的是，该反应机制涉及结合在一氧化碳脱氢酶中一个镍原子上的CH_3基团，与结合在一氧化碳脱氢酶中一个铁原子上的CO以及辅酶A相结合，形成终产物乙酰-CoA。该机制是生物化学中发现的第一个烷基镍反应。

因为同型产乙酸菌能够依靠乙酰-CoA途径中的反应生长，所以该系列反应总体上一定是储能的（图17.41）。ATP合成的一个位置是在乙酰-CoA转化成乙酸的过程中（经过乙酰-P，见17.19节），然而由于在乙酸生成过程中建立了一个跨细胞质膜的钠动力（类似于质子动力，但是以Na^+代替了H^+），会发生额外的储能反应，这种激发态的膜借助于一种Na^+推动的ATPase的活性使能量得以储存。类似的情况也出现在琥珀酸发酵菌生丙酸菌（*Propionigenium*）中，该菌由Na^+梯度储能的情形将在17.20节中讨论。

概念检查

同型产乙酸菌是将CO_2还原成乙酸的厌氧菌，通常以H_2为电子供体。乙酸形成的机制是乙酰-CoA途径，该途径是广泛分布于专性厌氧菌中的一系列反应，或作为一种自养的机制，或用于乙酸的分解代谢。

◆ 画出乙酸的结构，确定羰基和甲基。乙酰-CoA途径中的什么关键酶产生乙酸的羰基？

◆ 同型产乙酸菌是如何从乙酸的合成中产生ATP的？

◆ 如果果糖经过糖酵解分解代谢只产生2分子的乙酸，醋酸梭菌是如何能够通过该途径发酵果糖，并且产生3分子乙酸的？

17.17 产甲烷作用

甲烷的生物生成——产甲烷作用（methanogenesis），是由一群被称为产甲烷菌（methanogen）的严格厌氧古生菌进行的。在13.4节中我们讨论了产甲烷菌的基本性质、系统发育和分类，本节侧重于它们的生物化学与生物能学。甲烷的生物生成通过一系列相当复杂的反应进行，涉及新的辅酶。下面我们从产甲烷反应的核心——辅酶，以及从底物H_2+CO_2开始讨论甲烷的生成过程。

产甲烷作用中的C_1载体

产甲烷作用中关键的辅酶可以分为两类：①参与将起始底物CO_2的C_1单位运送至终产物的辅酶；②在为CO_2还原成CH_4提供所需电子的氧化还原反应中起作用的辅酶（图17.42和图17.44）。

辅酶甲烷呋喃（methanofuran）与产甲烷作用的第一步反应有关，甲烷呋喃含有五元的呋喃环和 1 个结合 CO_2 的氨基氮原子（图 17.42a）。甲烷蝶呤（methanopterin）（图 17.42b）是一个产甲烷的辅酶，与维生素叶酸类似（图 20.17c），并且是 CO_2 还原成 CH_4 的中间步骤的 C_1 载体。辅酶 M（CoM）（图 17.42c）是一个小分子物质，与产甲烷作用的终端反应，即与将甲基（CH_3）转化成 CH_4 有关。尽管含镍的四吡咯辅酶 F_{430}（图 17.42d）不是一个 C_1 载体，但它作为甲基还原酶复合物（见后面）的一部分也参与了产甲烷作用的终端反应。

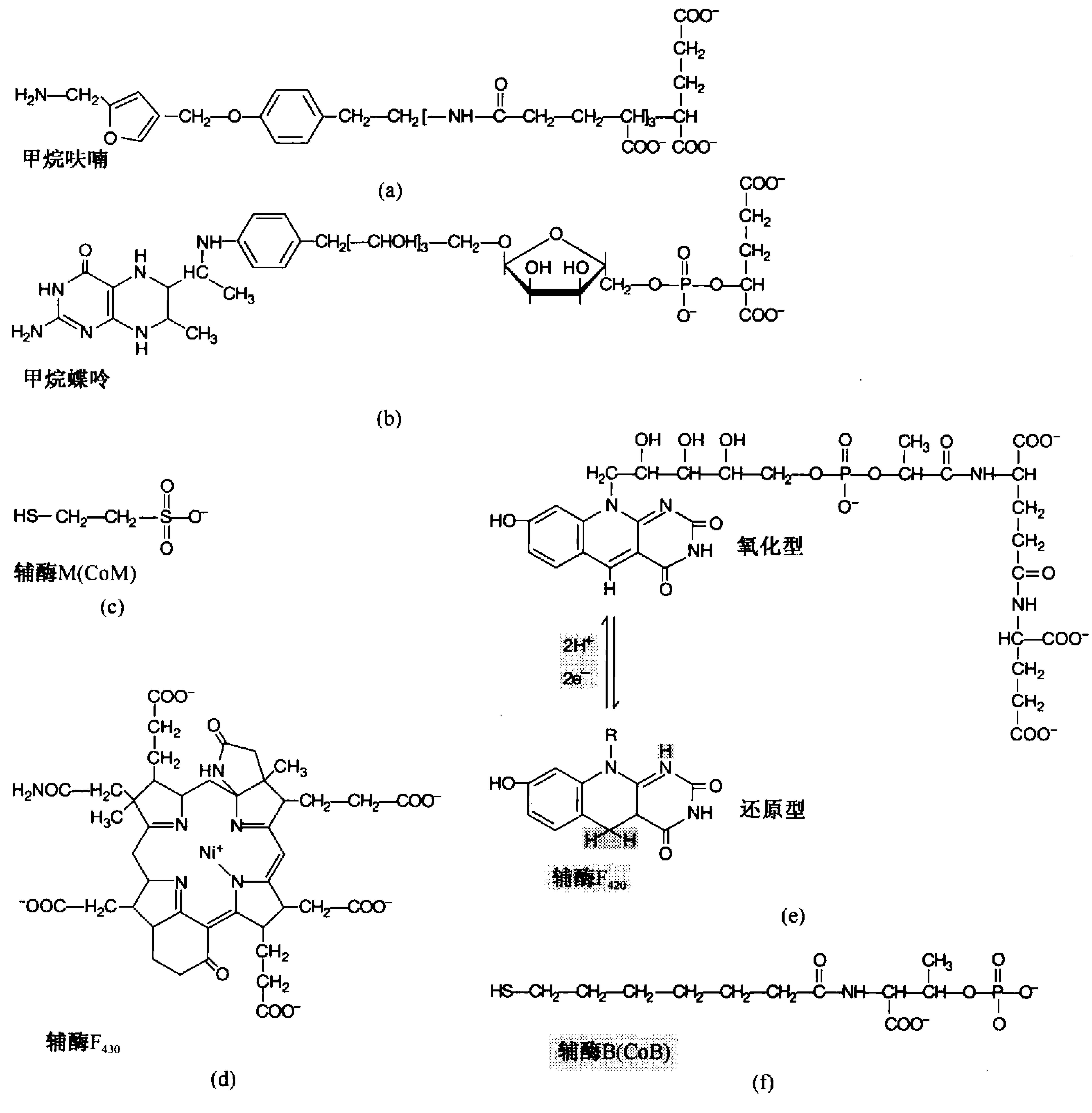
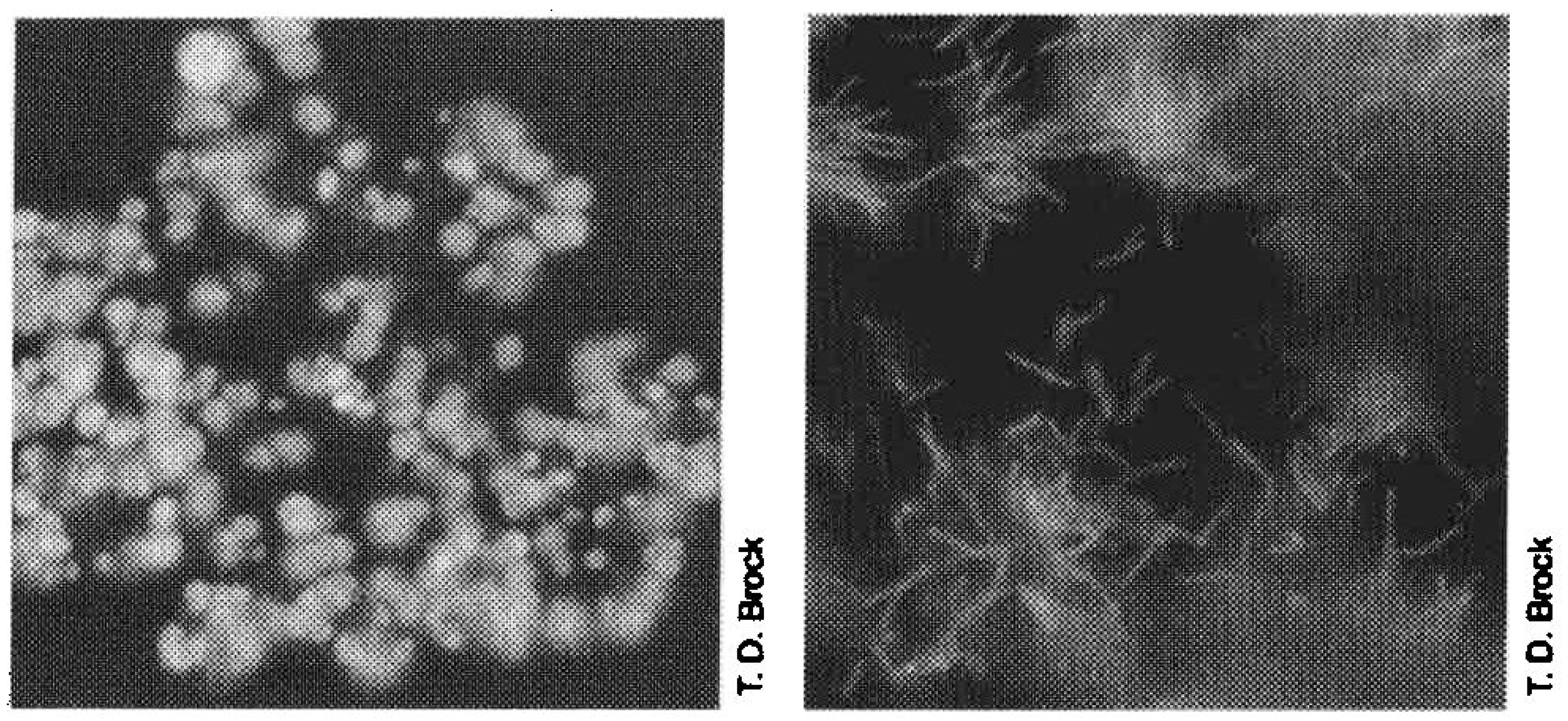


图 17.42　产甲烷古生菌的辅酶。棕色或黄色阴影的原子是氧化还原反应的位点（F_{420}，棕色）或在 CO_2 还原成 CH_4 的过程中 C_1 部分结合的位置（甲烷呋喃、甲烷蝶呤、辅酶 M，黄色）。在图 17.44～图 17.46 中使用相同的颜色突出特殊辅酶自身（如辅酶 B 是橙色），并且该颜色可以在每个图中的反应式中使用。

氧化还原辅酶

辅酶 F_{420} 和 7-巯基庚酰苏氨酸磷酸（7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate），即

辅酶 B（CoB）是产甲烷作用中的电子供体。辅酶 F_{420}（图 17.42e）是一种黄素衍生物，结构上与常见的黄素辅酶 FMN 类似（图 5.15），在产甲烷作用中，辅酶 F_{420} 也是 CO_2 还原过程中几个步骤的电子供体（图 17.44）。氧化形式的 F_{420} 在 420nm 处吸光，发出蓝绿色荧光，这种荧光性可用于产甲烷菌的显微鉴定（图 17.43）。CoB 与由甲基还原酶复合物（methyl reductase enzyme complex）催化的产甲烷作用的终端反应有关，正如图 17.42f 所示，CoB 的结构与维生素泛酸（乙酰-CoA 的一部分）（图 5.12）类似。



(a)　　(b)

图 17.43　由产甲烷辅酶 F_{420} 引起的绿色荧光。（a）由于存在独特的电子载体 F_{420}，产甲烷菌巴氏甲烷八叠球菌（*Methanosarcina barkeri*）细胞内产生自身荧光。单个细胞直径约 1.7μm，荧光显微观察时，该生物体蓝光下可见（见 4.1 节和图 4.6）。（b）产甲烷菌甲酸甲烷杆菌（*Methanobacterium formicicum*）细胞内的 F_{420} 荧光，单个细胞直径约 0.6μm。

CO_2 还原为 CH_4 的生物化学

CO_2 还原成 CH_4 通常从 H_2 开始，但是甲酸、一氧化碳，甚至某种有机化合物如醇类也能够为 CO_2 还原提供电子，图 17.44 给出了 CO_2 被 H_2 还原的步骤：

（1）CO_2 被一个含有甲烷呋喃的酶活化，随后被还原成甲酰。

（2）甲酰基从甲烷呋喃转移至一个含有甲烷蝶呤的酶（图 17.44 中的 MP），随后脱水分两步还原成亚甲基和甲基。

（3）甲基从甲烷蝶呤转移至一个含有 CoM 的酶。

（4）CH_3-CoM 被甲基还原酶系统还原成甲烷，F_{430} 和 CoB 与甲基还原酶系统密切相关，辅酶 F_{430} 将 CH_3 从 CH_3-CoM 上移去，形成一个 Ni^{2+}-CH_3 复合物，该复合物被来自 CoB 的电子还原，产生 CH_4 和一个 CoM 与 CoB 的二硫复合物（CoM-S-S-CoB）。

（5）CoM-S-S-CoB 被 H_2 还原，使游离的 CoM 和 CoB 得以再生。我们将会了解到，在产甲烷作用中，正是该反应使能量得以保存。

从甲基化合物和乙酸生成甲烷

在 13.4 节中我们得知，除了 H_2+CO_2 外，甲烷还能够由许多甲基化的化合物形成。甲基化合物（如甲醇）进行分解代谢，将甲基提供给一个类咕啉蛋白形成 CH_3-类咕啉（图 17.45），类咕啉是维生素 B_{12} 这一类化合物的母结构，含有一个类似卟啉的咕

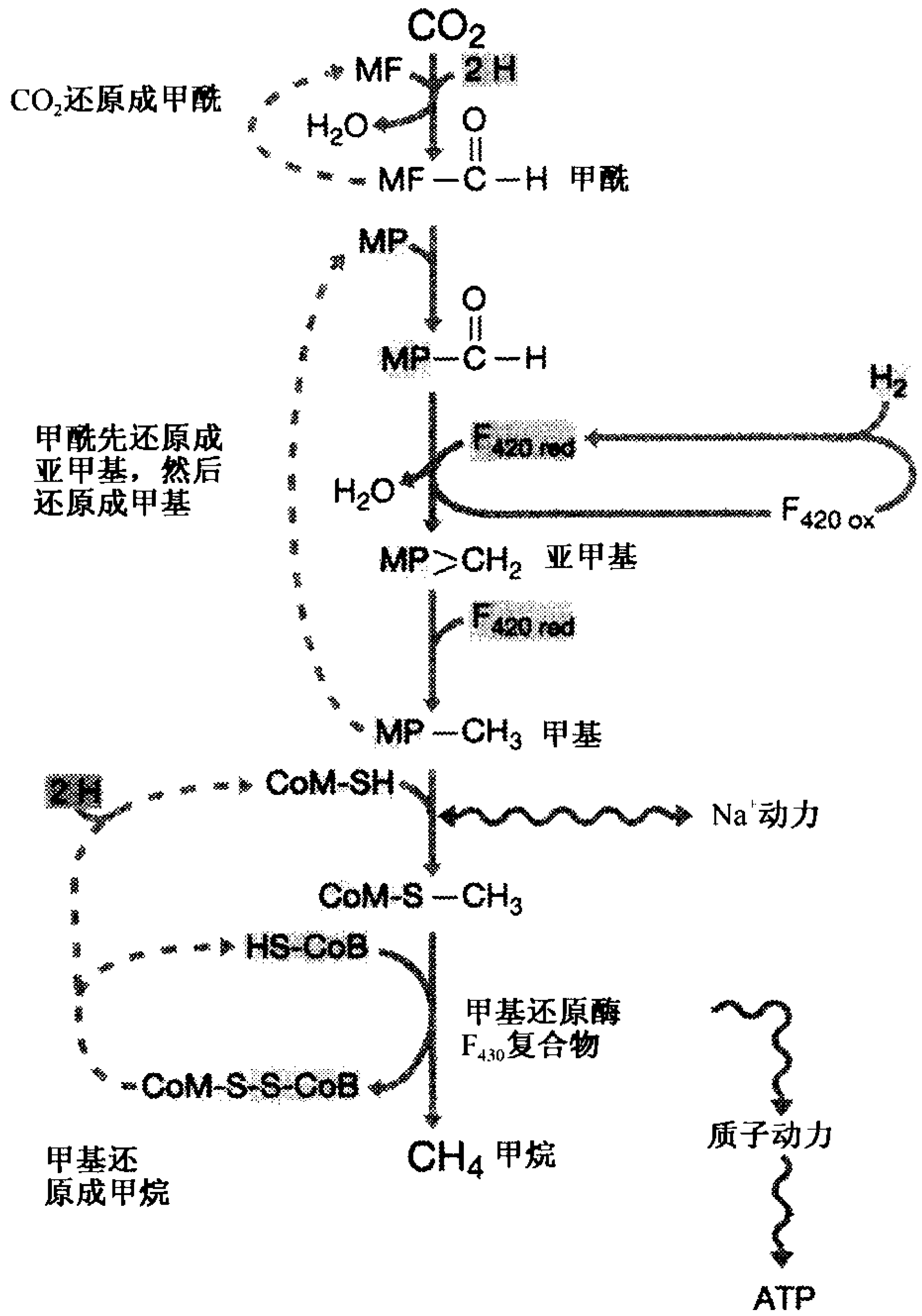


图 17.44 以 H_2 为电子供体，从 CO_2 开始的甲烷产生途径。 MF：甲烷呋喃；MP：甲烷蝶呤；CoM：辅酶 M；F_{420red}：还原态辅酶 F_{420}；F_{430}：辅酶 F_{430}；CoB：辅酶 B。被还原的碳原子以黄色显示，电子来源以棕色突出显示。有关辅酶的结构以及可逆 Na^+ 泵的讨论文字见图 17.42。产甲烷作用第一步反应的中间电子供体尚未知晓。用于 CO_2 还原的电子通常来自 H_2，但是在某些产甲烷菌中，少数有机化合物能够被氧化产生电子，供 CO_2 还原使用（见 13.4 节）。

啉环，环中心有 1 个钴原子（图 30.12）。CH_3-类咕啉复合物将甲基提供给 CoM，产生 CH_3-CoM，然后按照刚才所描述过的 CO_2 还原的终端步骤相同的方式形成甲烷（将图 17.44 与图 17.45a 进行比较）。如果得不到驱动终端步骤的还原力（如 H_2），一些甲醇必须被氧化成 CO_2 以便产生电子，该过程通过产甲烷作用的反向步骤来实现（图 17.45a）。

当乙酸为产甲烷作用的底物时，乙酸首先被活化成乙酰-CoA，乙酰-CoA 与乙酰-CoA 途径中的一氧化碳脱氢酶（见 17.16 节）相互作用，然后乙酸的甲基被转移至类咕啉酶产生 CH_3-类咕啉，再进入 CoM 介导的产甲烷作用的终端步骤（图 17.45b），CO 则同时被氧化成 CO_2。

自养

产甲烷菌的自养代谢通过 17.16 节所述的乙酰-CoA 途径来进行。正如我们所知，

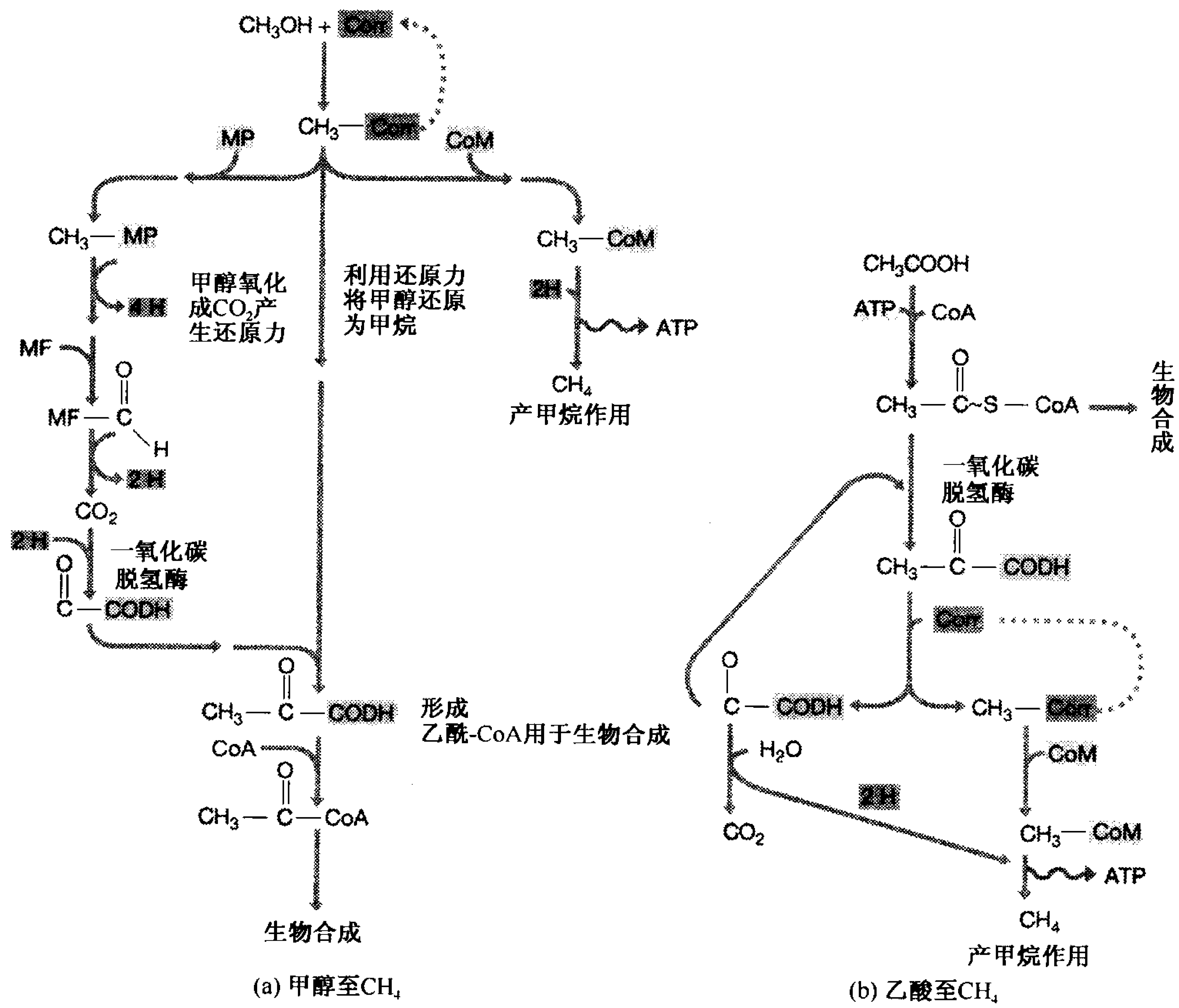


图 17.45 甲醇和乙酸转化成甲烷。两个反应系列均涉及乙酰-CoA 途径（图 17.41）的部分步骤。以甲醇生长时，多数甲醇的碳被转变成 CH_4，少数被转变成 CO_2 或者形成乙酰-CoA 后被同化成细胞物质。缩写和颜色编码与图 17.42 和图 17.44 相同。Corr：含类咕啉的蛋白；CODH：一氧化碳脱氢酶。

该途径的部分步骤已经与甲醇和乙酸的分解代谢相整合（图 17.45）。然而，产甲烷菌缺少乙酰-CoA 途径中被四氢叶酸所驱动的可产生甲基的系列反应（图 17.41）。不过这并不成问题，因为产甲烷菌既可以直接从它们的电子供体中得到甲基（图 17.45），又可以在甲烷生成过程中利用 H_2+CO_2 产生甲基（图 17.44），因此在细胞中可利用的甲基含量丰富。在产甲烷菌自养生长过程中所产生的乙酸的羰基来自一氧化碳脱氢酶，乙酸合成中的终端步骤按同型产乙酸菌中所描述的进行（见 17.16 节和图 17.41）。

产甲烷作用中能量的保存

在标准条件下，利用 H_2 将 CO_2 还原为 CH_4 时自由能的变化为 −131kJ/mol，足够用来合成至少 1 个 ATP。我们说过在产甲烷作用中能量的保存与终端步骤甲基还原酶步骤相连接（图 17.44），在终端步骤中 CoB 与 CH_3-CoM 相互作用，形成 CH_4 和一个杂二硫化物 CoM-S-S-CoB，该复合物被来自 F_{420} 的电子还原，使 CoM-SH 和 CoB-SH 得以再生（图 17.44）。这个由杂二硫化物还原酶（heterodisulfide reductase）催化的反

应为放能反应，并且同时将一个质子排出膜外，产生 1 个质子动力（图 17.46）。

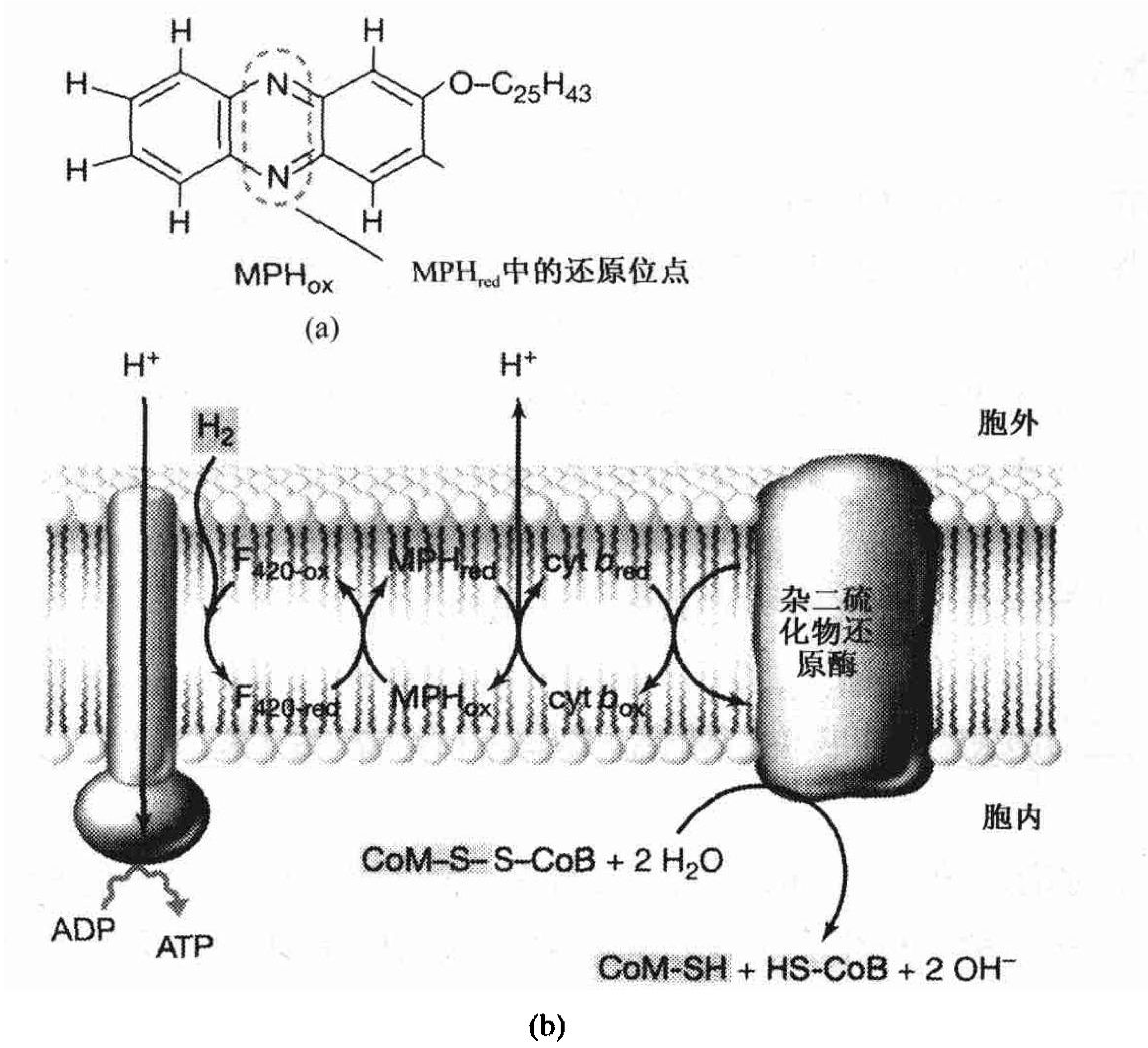


图 17.46 产甲烷作用中能量的保存。（a）甲烷吩嗪（b 图中以 MPH 表示）的结构，甲烷吩嗪是导致 ATP 合成的电子传递链中的一种电子载体，其分子的中央环可被交替还原和氧化。（b）电子传递步骤。来自 H_2的电子将 F_{420}还原，然后 F_{420}将甲烷吩嗪还原，甲烷吩嗪通过一种 b 型细胞色素将杂二硫化物还原酶还原，同时将 1 个质子挤出膜外。在最后的步骤中，杂二硫化物还原酶将 CoM-S-S-CoB 还原成 CoM-SH 和 CoB-SH。CoM 和 CoB 的结构参见图 17.42。

在产甲烷作用过程中，质子转移 ATPase（5.12 节讨论了 ATPase）消耗质子梯度，驱动 ATP 合成，这种方式与其在其他形式的呼吸作用中所进行的相同。电子向杂二硫化物还原酶的流动与一种独特的膜整合电子载体——被称为甲烷吩嗪（methanophenazine）的吩嗪化合物有关（图 17.46）。在终端步骤的电子传递过程中，甲烷吩嗪交替被还原（被 F_{420}）然后被氧化（被一种 b 型细胞色素），b 型细胞色素是杂二硫化物还原酶最后的电子供体（图 17.46）。

从甲基化合物生成甲烷也与杂二硫化物还原酶质子泵相连接，但是还涉及另外一个因素。正如前面所提到的，在没有 H_2时，从像 CH_3OH 这样的化合物生成甲烷时，需要将一些 CH_3OH 氧化成 CO_2以便产生电子来满足甲基还原成甲烷的需求（图 17.45）。该过程需要输入能量，并消耗 1 个 Na^+动力（1 个 Na^+激发的膜电位，见 17.20 节）来进行，这个电位的固有能量是由甲烷生成过程中 CH_3-MP 转化为 CH_3-CoM 产生的。反向反应消耗能量，并由 Na^+泵驱动。甲基转化为 CO_2过程中进一步的氧化反应通过导致 CO_2形成 CH_4的酶反应步骤的逆反应来进行（图 17.44）。

因此，在产甲烷菌中我们见到了两种类型的 ATPase：一种是典型的质子泵，用于

驱动三磷酸腺苷（ATP）的合成；另一种是 Na^+ 泵，具有驱动甲基氧化的功能。

概念检查

产甲烷作用是利用 CO_2+H_2 或甲基化的化合物生物法生成甲烷。多种独特的辅酶参与了产甲烷作用，并且该过程严格厌氧。产甲烷作用中能量的保存涉及质子梯度和钠离子梯度。

◆ 在产甲烷作用中，作为 C_1 载体的辅酶是什么？作为电子供体的呢？

◆ 在产甲烷作用中，为什么如果 H_2 存在时 CH_3OH 分解代谢的步骤与 H_2 不存在时有所不同？

◆ 在产甲烷作用中，质子动力是如何产生的？

17.18 三价铁、锰、氯酸盐和有机电子受体

除了迄今讨论过的厌氧呼吸的电子受体外，三价铁（Fe^{3+}）、锰离子（Mn^{4+}）、氯酸盐（ClO_3^-）和多种有机化合物也是自然界中细菌的重要电子受体（图 17.47）。有多

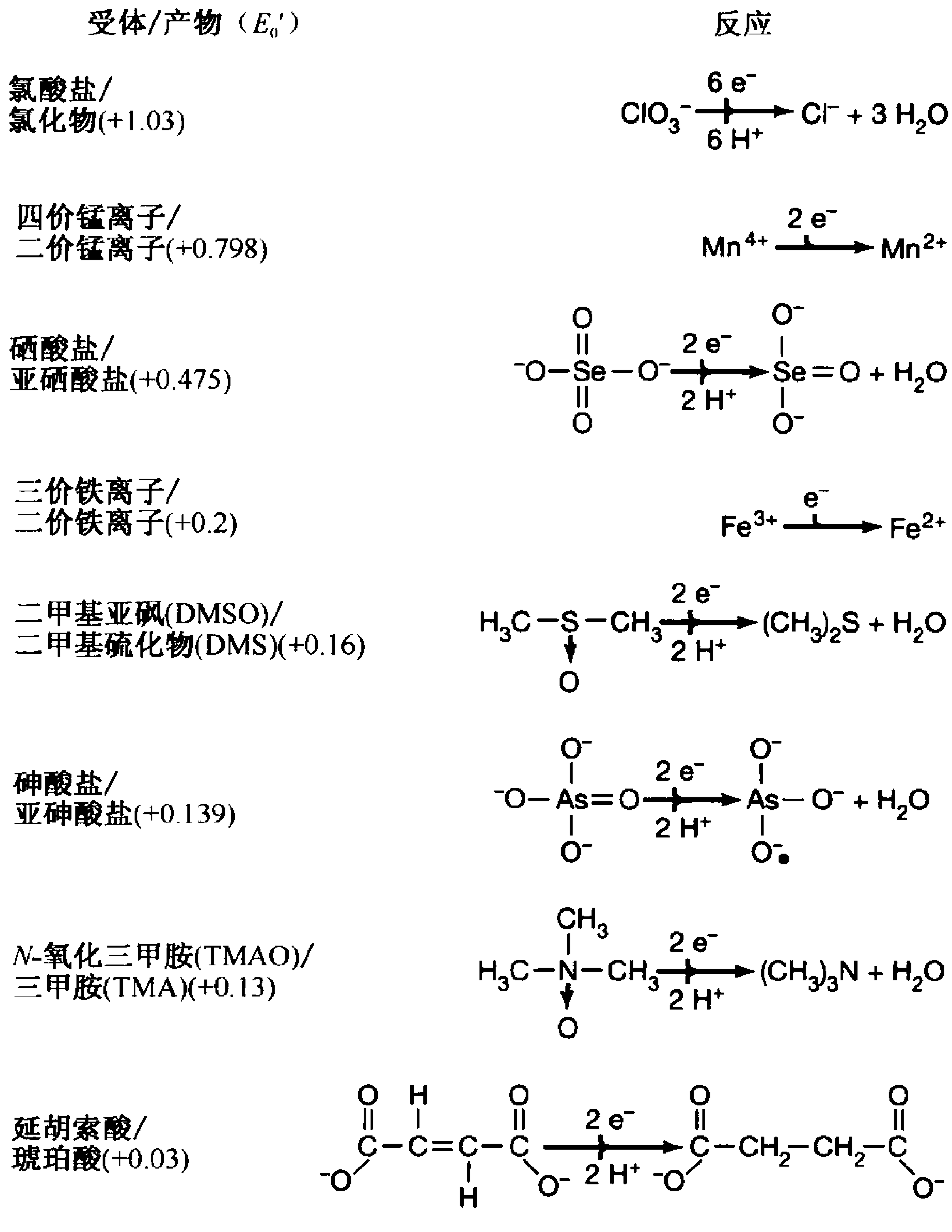


图 17.47 厌氧呼吸的一些替代电子受体。注意不同受体 E_0' 的差别。

种细菌能够还原这些受体，尤其是 Fe^{3+}，也有许多细菌能够还原其他的受体，如 NO_3^- 和 S^0（见 17.14 节和 17.15 节）。

Fe^{3+} 的还原

在许多化能有机营养细菌及化能无机营养细菌中，Fe^{3+} 均可作为电子受体用于能量代谢。并且由于 Fe^{3+} 在自然界中含量丰富，因此 Fe^{3+} 的还原是厌氧呼吸的主要形式。Fe^{3+}/Fe^{2+} 电偶联的还原电位稍微呈正电性（pH 7 时，$E_0'=+0.2V$），因此 Fe^{3+} 的还原能够与几种有机和无机电子供体的氧化相偶联。包括芳香化合物在内的多种有机化合物能够被 Fe^{3+} 还原菌厌氧氧化，在所有情况下电子均通过电子传递链最终传至一个 Fe^{3+} 还原酶系统，电子流建立起质子动力可用于产生 ATP。有关 Fe^{3+} 还原的能量学的许多研究都是以革兰氏阴性菌腐败希瓦氏菌（*Shewanella putrefaciens*）为材料进行的，当多种有机电子供体存在时它便依赖 Fe^{3+} 进行厌氧生长。其他重要的 Fe^{3+} 还原菌还包括土杆菌（*Geobacter*）、地螺旋菌（*Geospirillum*）和地弧菌（*Geovibrio*）。

金属还原土杆菌（*Geobacter metallireducens*）已经成为研究 Fe^{3+} 还原生理学的模式菌。这种菌能够按照下式以 Fe^{3+} 为受体氧化乙酸：

$$CH_3COO^- + 8Fe^{3+} + 4H_2O \longrightarrow 2HCO_3^- + 8Fe^{2+} + 9H^+ \longrightarrow \Delta G^{0'} = -233kJ$$

土杆菌还能够利用 H_2 或有机电子供体，包括芳香烃甲苯（甲苯的结构见图 17.56c）。这可能在环境上具有重要意义，因为从烃储存罐中意外泄漏的甲苯经常污染富含 Fe^{3+} 的蓄水层，而像土杆菌这样的生物就可以作为上述环境中的天然清洁剂。

锰（Mn^{4+}）和其他无机物的还原

金属锰有许多氧化态，其中 Mn^{4+} 和 Mn^{2+} 是最稳定的，而且与生物的关系也最密切。许多微生物，主要是化能有机营养菌，可以将 Mn^{4+} 无氧还原成 Mn^{2+}。腐败希瓦氏菌以及其他一些细菌，可以利用 Mn^{4+} 为电子受体，在乙酸及其他一些的非发酵性碳源上进行无氧生长。Mn^{4+}/Mn^{2+} 电偶联的还原电位非常高（图 17.47），因此一些化合物应该能够将电子提供给 Mn^{4+} 用于还原。对氯酸盐来说也是如此，因为氯酸盐的还原电位也非常高（图 17.47）。已经分离出几种氯酸盐还原细菌，它们多数是兼性菌，能够好氧生长。

其他无机物也可以作为电子受体用于厌氧呼吸，其中包括硒和砷的化合物（图 17.47）。虽然硒化合物和砷化合物在自然界中并非大量存在，但它们偶尔可以成为污染物，能够维持一些细菌的厌氧生长。从 SeO_4^{2-} 还原到 SeO_3^{2-}，最终还原成 Se^0（金属硒）是一种从水中处理掉硒的重要方法，已经用于净化（生物修复）（见 19.19 节）被硒污染的土壤。相反，从砷酸盐还原成亚砷酸盐却会产生毒性问题。一些地下水会流经含有相对来说不溶的砷酸盐矿物的岩石，如果砷酸盐被细菌还原成亚砷酸盐的话，亚砷酸盐易移动，能够污染地下水。近年来在孟加拉国，这已经成为井水砷污染中的严重问题。

其他形式的砷酸盐还原则是有益的。例如，硫酸盐还原细菌脱硫肠状菌（*Desulfotomaculum*）在将 SO_4^{2-} 还原为 HS^- 时，能够将砷酸盐（AsO_4^{3-}）还原成亚砷酸盐（AsO_3^{3-}），在这个过程中，一种砷和硫化物的矿物复合物 As_2S_3 自发沉淀（图

17.48)，这种矿物在胞内和胞外均可以形成，是生物矿化（biomineralization，即通过细菌活动形成矿物）的一个实例。此时，As_2S_3的形成（图 17.48）还可以作为一种解除毒性化合物（砷）的方法，这种方法可以用于含砷废物的微生物净化。

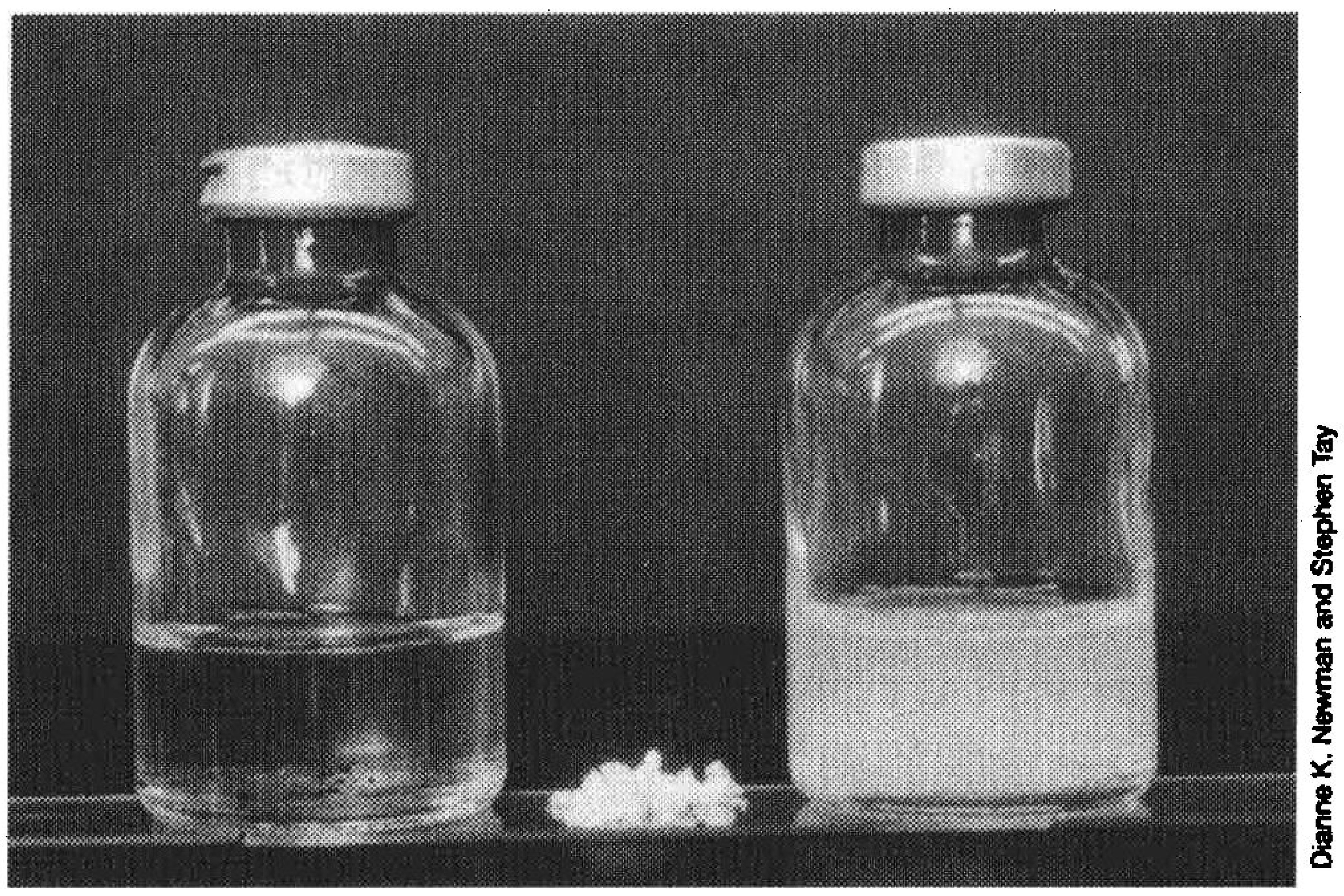


图 17.48 硫酸盐还原细菌雌黄脱硫肠状菌（*Desulfotomaculum auripigmentum*）还原砷酸盐过程中三硫化砷（As_2S_3）矿物的产生。左，接种后培养瓶的外观；右，2 周后的生长状况；中间，合成的 As_2S_3样品。依靠微生物产生矿物称为生物矿化。

有机电子受体

有几种有机化合物能够作为外源电子受体参与厌氧呼吸，在图 17.47 所列的这些化合物中，研究最为深入的是延胡索酸（fumarate），它可以被还原成琥珀酸（succinate）。对柠檬酸循环（citric acid cycle，图 5.22）的分析可知延胡索酸和琥珀酸均是重要的中间物。延胡索酸作为厌氧呼吸电子受体这一功能可以从下述事实中得到验证，即延胡索酸-琥珀酸电偶联的还原电位接近于零（图 17.35），允许延胡索酸的还原和 NADH 或 H_2的氧化相偶联，所产生的能量足够用于合成 1 个 ATP。能够以延胡索酸作为电子受体的细菌有产琥珀酸沃林氏菌（*Wolinella succinogenes*）（该菌能够分别以 H_2为电子供体延胡索酸作为电子受体进行生长）、巨大脱硫弧菌（*Desulfovibrio gigas*）（一种能在非硫酸盐还原条件下生长的硫酸盐还原菌）、一些梭菌、大肠杆菌以及许多其他的细菌。

氧化三甲胺（trimethylamine oxide，图 17.47）是一种重要的有机电子受体。氧化三甲胺（TMAO）是海洋鱼类的一种产物，海洋鱼类通过氧化三甲胺排出多余的氮。许多细菌能够将 TMAO 还原成三甲胺（TMA），TMA 具有强烈的气味，腐烂海鱼发出的一些气味就是由细菌活动生成的 TMA 所产生的。多种兼性好氧细菌可以利用 TMAO 作为替代的电子受体，此外几种光养紫色细菌（见 12.2 节）能够利用 TMAO 作为电子受体在黑暗中进行无氧代谢。

二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）是类似于 TMAO 的一种化合物，可以被许多细菌还原成二甲基硫化物（DMS）。DMSO 是一种常见的天然产物，在海水和淡水环境中均可发现 DMSO。DMS 具有强烈的刺激性气味，细菌将 DMSO 还原成 DMS，

可以用 DMS 的特征性气味作为标志。多种细菌包括弯曲杆菌属（*Campylobacter*）、埃希氏菌以及许多紫色细菌都能够利用 DMSO 为电子受体产生能量（有关 DMSO 代谢的进一步讨论见 19.13 节）。

TMAO/TMA 和 DMSO/DMS 的还原电位类似，均为＋0.15V 左右，这就意味着任何以 TMAO 或 DMSO 还原为终止的电子传递链肯定相当短。像延胡索酸一样，在 TMAO 和 DMSO 还原的大部分例子中，b 型细胞色素（其还原电位接近 0V）被确认为终端氧化酶。

卤代化合物作为电子受体：还原脱氯作用

几种氯代化合物在被称为还原脱氯作用（reductive dechlorination）或脱卤呼吸（dehalorespiration）作用的过程中，能够作为厌氧呼吸的电子受体。例如，硫酸盐还原细菌脱硫念珠菌（*Desulfomonile*）能够以 H_2 或有机化合物为电子供体，以氯苯甲酸为电子受体进行厌氧生长：

$$C_7H_4O_2Cl^- \text{（3-氯苯甲酸）} + 2H \longrightarrow C_7H_5O_2^- \text{（苯甲酸）} + HCl$$

除了脱硫念珠菌（仍是一种硫酸盐还原菌，表 17.5）以外，还有相当多的其他细菌能够还原脱氯，其中有一些仅限于以氯代化合物为电子受体（表 17.5）。许多被还原的氯代化合物对鱼和其他动物有毒，而许多脱氯的产物则毒性很低甚至完全无毒。例如，脱卤拟球菌（*Dehalococcoides*）能够将三氯乙烯和四氯乙烯还原成无害的气体乙烯（表 17.5）。脱卤杆菌（*Dehalobacterium*）能够将毒性化合物二氯甲烷（CH_2Cl_2）转化成脂肪酸乙酸酯和脂肪酸甲酸酯。因此，还原脱氯作用不仅是一种能量代谢的形式，也是一种利于环境的生物修复过程（见 19.18 节）。许多还原脱氯菌还能够还原硝酸盐或多种还原态硫化合物（表 17.5），所以这类菌既包括专一脱氯的种类，又包括兼性脱氯的种类。

表 17.5　还原脱氯菌主要属的特征

性质	属			
	脱卤菌（*Dehalobacter*）	脱硫念珠菌（*Desulfomonile*）	脱亚硫酸杆菌（*Desulfitobacterium*）	脱卤拟球菌（*Dehalococcoides*）
电子供体	H_2	H_2、甲酸、丙酮酸、乳酸、苯甲酸	H_2、甲酸、丙酮酸、乳酸	H_2、乳酸
电子受体	三氯乙烯、四氯乙烯	间氯苯甲酸、四氯乙烯、SO_4^{2-}、SO_3^{2-}、$S_2O_3^{2-}$	邻氯苯酚、间氯苯酚、或对氯苯酚、NO_3^-、甲酸、SO_3^{2-}、$S_2O_3^{2-}$、S^0	三氯乙烯、四氯乙烯
四氯乙烯的还原产物	二氯乙烯	二氯乙烯	三氯乙烯	乙烯
其他性质[a]	含有细胞色素 b	含有细胞色素 c_3、需要有机碳源、能够发酵丙酮酸生长	也能发酵生长	缺少肽聚糖
系统发育[b]	属于低 GC 值的革兰氏阳性菌	属于 δ-变形菌纲（delta *Proteobacteria*）	属于低 GC 值的革兰氏阳性菌	属于绿色非硫细菌（绿屈挠菌属）

a. 均为专性厌氧菌。

b. 原核生物系统发育的讨论见第 12 章和图 12.1。

概念检查

除了无机氮化合物和硫化合物或CO_2外，还有许多其他的有机和无机物能够作为厌氧呼吸的电子受体，尤其是Fe^{3+}、Mn^{4+}、延胡索酸和某种氯代化合物。

- 若H_2为电子供体，为什么Fe^{3+}的还原反应比延胡索酸的还原反应更容易进行？
- 举出生物矿化的一个例子。
- 自然界中TMAO降解菌有可能在哪里含量丰富？为什么？
- 什么是还原脱氯作用？

Ⅳ 生命的厌氧途径：发酵和互养共栖

17.19 发酵：能量和氧化还原的重要性

因为氧气在水中溶解度不高（25℃空气中平衡时为9.6mg/L蒸馏水），所以许多环境都容易缺氧。在这种环境中有机物的降解必须在无氧条件下进行。如果在这种无氧环境中像SO_4^{2-}、NO_3^-、Fe^{3+}以及前面所讨论的其他电子受体供给不足的话，许多含碳化合物将通过发酵（fermentation）进行分解代谢（CO_2作为电子受体时是个例外，在无氧环境中CO_2几乎不受限制，但是CO_2转化成甲烷需要H_2，而H_2本身就是发酵反应的一个产物）。在5.9节和5.10节中我们讨论过发酵的整个过程，从中得知发酵是一个内部平衡的氧化还原过程，在该过程中可发酵的底物部分被氧化，部分被还原（图17.49）。

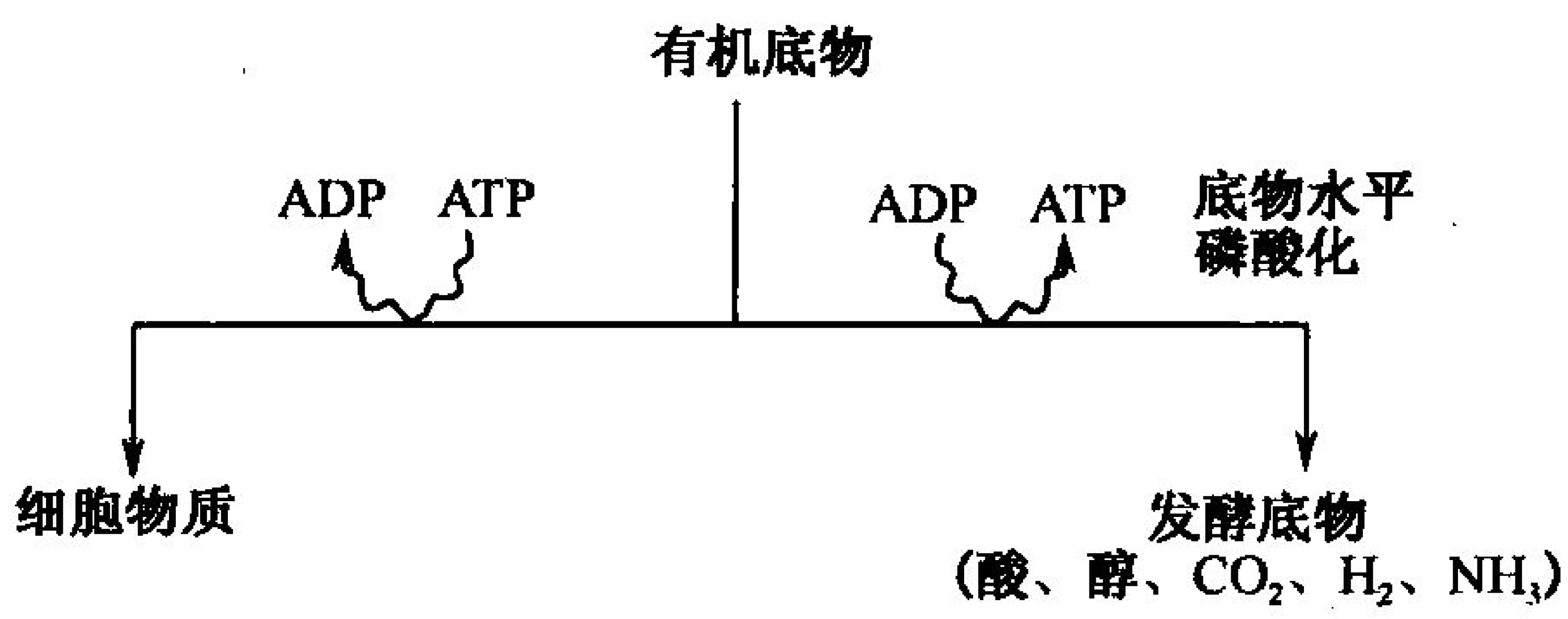


图17.49 发酵的全过程。在典型的发酵过程中，大多数碳作为能量代谢的部分还原终产物被释放，仅有一小部分用于生物合成。

如果一个生物体想在产能代谢中分解代谢有机化合物，那么它面临两个需解决的问题：①保存一些能以ATP形式释放的能量；②去除从电子供体中移走的电子。发酵时通常通过底物水平磷酸化（substrate-level phosphorylation）的方式合成ATP，底物水平磷酸化是将发酵有机中间体的高能磷酸键转移给ADP的一种机制（见5.9节）。第二个问题，即氧化还原平衡的问题，通过从起始底物产生并释放发酵产物来解决（图17.49和图17.50）。

高能化合物和底物水平磷酸化

可以通过许多途径进行底物水平磷酸化以保存能量。然而，ATP 合成机制的核心是产生高能化合物，这些物质是含有 1 个磷酸基或含有 1 个辅酶 A 分子的有机化合物，水解后放出大量的能量。表 17.6 列出了一些在生化过程中形成的高能中间体，所列的化合物大多数能够直接与 ATP 的合成相偶联（－31.8kJ/mol）。因此，如果某种生物在发酵代谢过程中能够形成这些化合物中的一种化合物，就能够合成 ATP。与氧化磷酸化（图 5.13）相比，底物水平磷酸化是一种更直接的产生 ATP 的方式，但是需要能源直接与高能中间体相偶联。图 17.50 中概括了各种可发酵物质厌氧分解为高能中间体的几种途径。

表 17.6 底物水平磷酸化所涉及的高能化合物[a]

化合物	水解自由能，$\Delta G^{0'}$/(kJ/mol)[b]	化合物	水解自由能，$\Delta G^{0'}$/(kJ/mol)[b]
乙酰辅酶 A	－35.7	1,3-二磷酸甘油酸	－51.9
丙酰辅酶 A	－35.6	氨甲酰磷酸	－39.3
丁酰辅酶 A	－35.6	磷酸烯醇丙酮酸	－51.6
琥珀酰辅酶 A	－35.1	腺苷磷酰硫酸	－88
乙酰磷酸	－44.8	N^{10}-甲酰四氢叶酸	－23.4
丁酰磷酸	－44.8	ATP 水解(ATP ⟶ ADP ＋ Pi)	－31.8

a. 数据来自 Thauer R K，Jungermann K，Decker K. 1977. *Bacteriol Rev* 41：100～180。

b. 此表给出的 $\Delta G^{0'}$ 值是“标准条件”下的数据，不一定是细胞内的数据。包括热损失，产生 1 个 ATP 需耗能约 60kJ 而不是 32kJ，因此这里给出的高能化合物水解所释放的能量有可能较高，但是为了简便及便于比较，以表中的数据视为每个反应所释放自由能的真实值。

微生物发酵产能

微生物发酵能产生多少 ATP 呢？我们已经知道在糖酵解中 1 分子葡萄糖发酵可产生 2～3 个 ATP（图 5.14），这可能是通过发酵所产生的最多的 ATP，许多其他的底物产能则较少。一种特定的发酵过程可能释放的能量可以通过反应的平衡和附录 1 所给出的自由能数值计算出来。例如，葡萄糖发酵生成乙醇和 CO_2，在理论上产生－235kJ/mol的能量，足够生成约 7 个 ATP，然而实际上仅产生 2 个 ATP，这就说明微生物对能量的控制利用效率远低于 100%，一些能量被作为热能释放。

氧化还原平衡和 H_2 的产生

任何发酵反应都存在着氧化和还原间的平衡，反应等式右侧产物的电子总数与等式左侧底物的电子总数相等。在实验室中进行发酵的试验研究时，通常通过计算发酵平衡（fermentation balance）来确保没有产物被遗漏。发酵平衡还可以根据底物和产物的氧化态（氧化态的计算过程见附录 1）从理论上进行计算。

在许多发酵过程中，通过产生 H_2 来保持电子的平衡。在 H_2 的产生过程中，来源于 H_2O 的质子作为电子受体。H_2 的产生一般与微生物中存在的一种被称为铁氧还蛋白的铁硫蛋白有关，铁氧还蛋白是一种电位非常低的电子载体。如图 17.51 所示，电子从铁

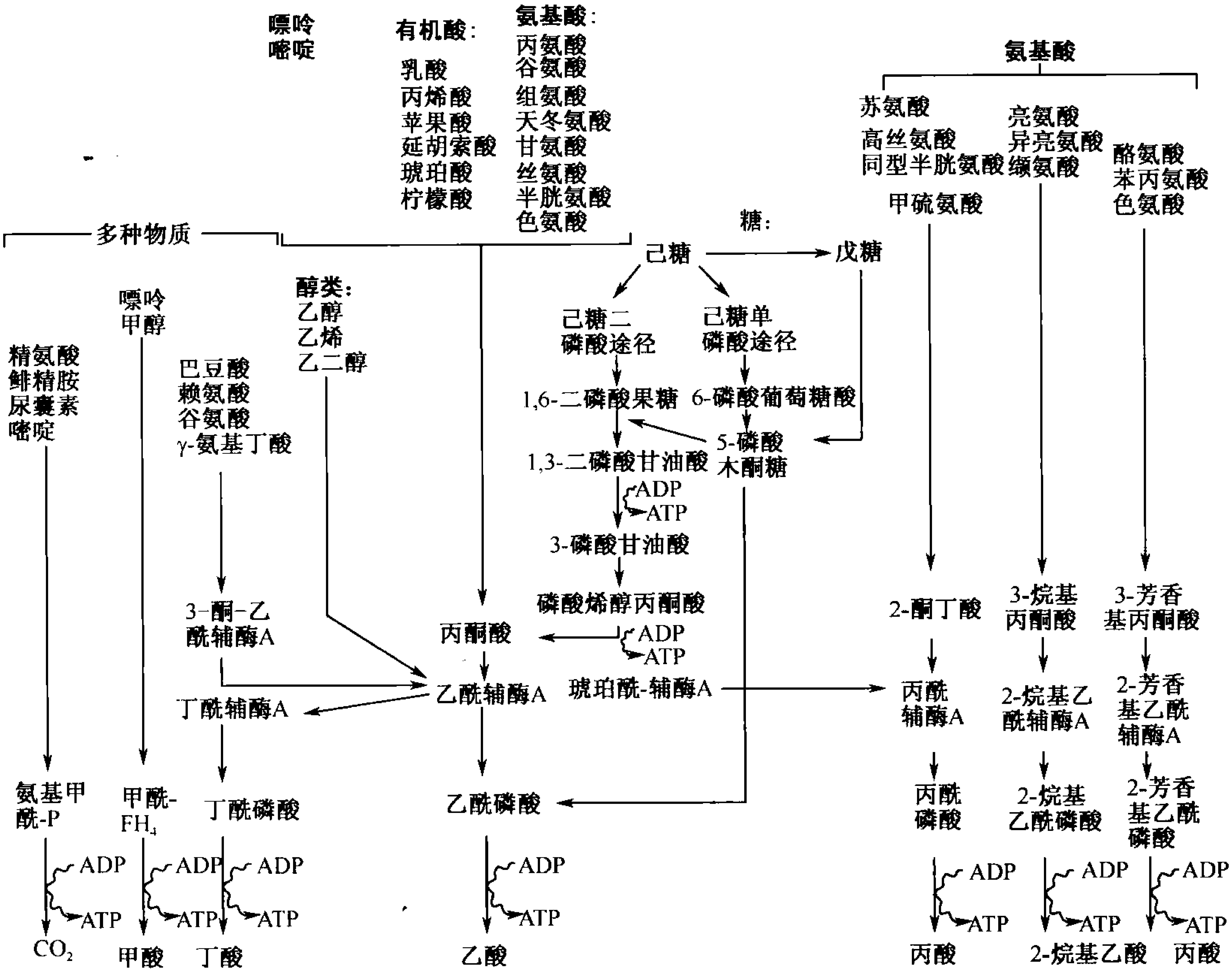


图 17.50 各种可发酵物质厌氧分解的主要途径。给出了底物水平磷酸化的位置，高能辅酶 A 衍生物和其他主要高能化合物以蓝色突出显示。参见表 17.6。

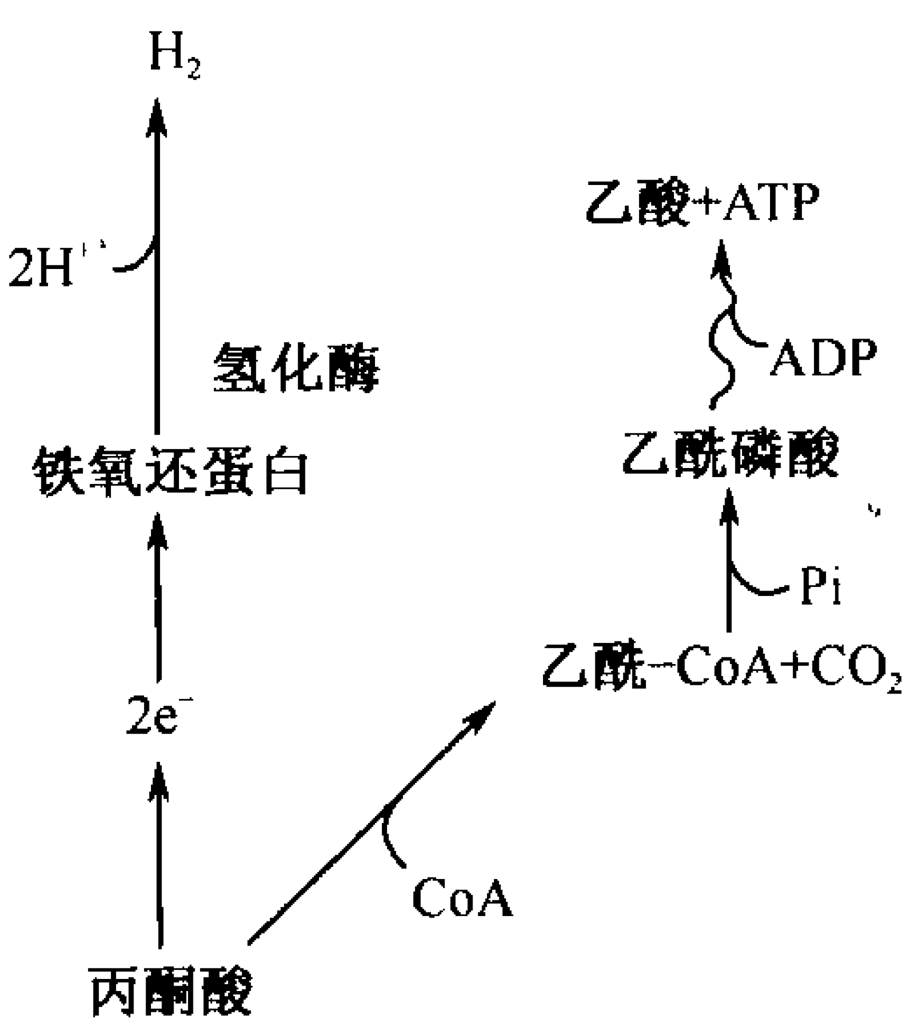


图 17.51 由丙酮酸产生 H_2 和乙酸。注意产生乙酸时是如何通过水解高能中间体乙酰磷酸（表 17.6）来合成 ATP 的。

氧还蛋白转移至 H^+ 是由氢化酶催化的。从能量学来看，氢的产生实际上是不太有利的，所以大部分发酵微生物在产生其他发酵产物的同时只产生相对较少的氢，因此氢的产生主要是为了保持氧化还原的平衡。

许多厌氧细菌产生乙酸作为一种发酵产物。产生乙酸或某种其他脂肪酸（表 17.6）从能学上讲占优势，因为它可以使菌体通过底物水平磷酸化来产生 ATP。在乙酸的产生过程中，所生成的关键中间体是乙酰辅酶 A（表 17.6 和图 17.50），它是一种高能中间体。乙酰辅酶 A 能够被转变成乙酰磷酸（表 17.6 中），随后，乙酰磷酸的磷酸基在乙酸激酶的作用下转移给二磷酸腺苷（ADP），产生 ATP。

被转变为乙酰辅酶 A 的一个主要底物是丙酮酸，它是糖酵解的主要产物之一。丙酮酸转变为乙酰辅酶 A 是一个氧化反应（图 17.51），反应产生的过量电子必须被用于产生一个还原性更强的终产物或者以 H_2 的形式释放。

概念检查

当缺少外来电子受体时，有机化合物只能通过发酵被分解代谢。只有特定的化合物可被发酵，并且大多数发酵都需要形成一个能通过底物水平磷酸化合成 ATP 的高能有机中间体。发酵过程中必须实现氧化还原的平衡，产生 H_2 是排出多余电子的一种方式。

◆ 什么是底物水平磷酸化?

◆ 为什么发酵过程中形成乙酸在能量方面是有利的?

17.20 发酵的多样性

发酵可以按照发酵底物或者按照所形成的发酵产物进行分类，在第 12 章和第 13 章中介绍原核生物的单个类群时，已经讨论了一些特殊的发酵反应，在此我们对常见的发酵作一概述。

发酵的多样性

表 17.7 概括了按照形成产物进行分类的一些主要的发酵类型，提到了一些主要的种类，如乙醇、乳酸、丙酸、混合酸、丁酸及同型乙酸。

大量的发酵过程不是依据发酵产物而是根据发酵底物进行分类的。例如，许多形成孢子的厌氧细菌（梭菌属）发酵氨基酸产生乙酸、氨和 H_2（图 12.59）。其他种类的梭菌，如尿酸梭菌（*Clostridium acidiurici*）和解嘌呤梭菌（*Clostridium purinolyticum*），发酵黄嘌呤或腺嘌呤，产生乙酸、甲酸、CO_2 和氨。还有其他的厌氧菌发酵芳香族化合物，例如，没食子酸居泥杆菌（*Pelobacter acidigallici*）可将芳香族化合物间苯三酚（1，3，5-三醇基苯，$C_6H_6O_3$）发酵为乙酸，并在乙酰辅酶 A 转化为乙酸的过程中保存能量（表 17.7）。

许多特殊的发酵仅存在于有限的几种厌氧菌中，有时仅存在于已知的单独菌株中，表 17.8 中列出了一些例子。可以认为多数这些细菌具有代谢上的专一性，通过生化上的进化获得了分解一种底物或者分解其他细菌不能分解的底物的能力。然而，对于表 17.7 中所列出的物质，微生物在发酵这些底物时需要能够产生表 17.6 中所列出的一种高能中间体，便于以 ATP 的形式储存能量。

表 17.7　常见的细菌发酵以及进行该发酵的一些微生物

类型	总反应[a]	微生物
乙醇发酵	己糖→2 乙醇+2CO_2	酵母、发酵单胞菌(*Zymomonas*)
同型乳酸发酵	己糖→2 乳酸$^-$+2H^+	链球菌(*Streptococcus*)、一些乳杆菌(*Lactobacillus*)
异型乳酸发酵	己糖→乳酸$^-$+乙醇+ CO_2+H^+	明串珠菌(*Leuconostoc*)、一些乳杆菌
丙酸发酵	乳酸$^-$→丙酸$^-$+乙酸$^-$+ CO_2	丙酸杆菌(*Propionibacterium*)、丙酸梭菌(*Clostridium propionicum*)

续表

类型	总反应[a]	微生物
混合酸发酵	己糖→乙醇+2,3-丁二醇+琥珀酸$^{2-}$+乳酸$^-$+乙酸$^-$+甲酸$^-$+H_2+CO_2	肠道菌群[b]、埃希氏菌(*Escherichia*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏菌(*Shigella*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、肠杆菌(*Enterobacter*)
丁酸发酵	己糖→丁酸$^-$+乙酸$^-$+H_2+CO_2	丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)
丁醇发酵	己糖→丁醇+乙酸$^-$+丙酮+乙醇+H_2+CO_2	丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)
己酸发酵	乙醇+乙酸$^-$+CO_2⟶己酸$^-$+丁酸$^-$+H_2	克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)
同型产乙酸发酵	果糖→3乙酸$^-$+3H^+ 4H_2+2CO_2+H^+⟶乙酸$^-$+2H_2O	醋酸梭菌(*Clostridium aceticum*)、乙酸杆菌(*Acetobacterium*)
产甲烷发酵	乙酸$^-$+H_2O⟶CH_4+HCO_3^-	鬃毛甲烷菌(*Methanosaeta*)、甲烷八叠球菌(*Methanosarcina*)

a. 总反应是对过程的一个概括，无需配平。

b. 不是所有的微生物都产生全部产物，尤其是丁二醇的产生只限于某种肠道细菌。

表 17.8 一些特殊的细菌发酵

类型	总的平衡反应式	菌株
乙炔	$2C_2H_2+3H_2O$⟶乙醇+乙酸$^-$+H^+	乙炔居泥杆菌(*Pelobacter acetylenicus*)
甘油	4甘油+2HCO_3^-→7乙酸$^-$+5H^++4H_2O	乙酸杆菌(*Acetobacterium* sp.)
间苯二酚(一种芳香化合物)	$2C_6H_4(OH)_2+6H_2O$→4乙酸$^-$+丁酸$^-$+5H^+	梭菌(*Clostridium* sp.)
间苯三酚(一种芳香化合物)	$C_6H_6O_3+3H_2O$→3乙酸$^-$+3H^+	玛斯里居泥杆菌(*Pelobacter massiliensis*)，没食子酸居泥杆菌(*Pelobacter acidigallici*)
丁二胺	10 $C_4H_{12}N_2+26H_2O$→6乙酸$^-$+7丁酸$^-$+20NH_4^++16H_2+13H^+	未分类的革兰氏阳性无芽孢的厌氧菌
柠檬酸	柠檬酸$^{3-}$+2H_2O→甲酸$^-$+2乙酸$^-$+HCO_3^-+H^+	拟杆菌(*Bacteroides* sp.)
乌头酸	乌头酸$^{3-}$+H^++2H_2O→2CO_2+2乙酸$^-$+H_2	发酵氨基酸球菌(*Acidaminococcus fermentans*)
乙醛酸	4乙醛酸$^-$+3H^++3H_2O→6CO_2+5H_2+羟乙酸$^-$	未分类的革兰氏阴性菌
琥珀酸	琥珀酸$^{2-}$+H_2O→丙酸$^-$+HCO_3^-	温和生丙酸菌(*Propionigenium modestum*)
草酸	草酸$^{2-}$+H_2O→甲酸$^-$+HCO_3^-	产甲酸草酸杆菌(*Oxalobacter formigenes*)
丙二酸	丙二酸$^{2-}$+H_2O→乙酸$^-$+HCO_3^-	深红丙二酸单胞菌(*Malonomonas rubra*)，丙二酸鼠孢菌(*Sporomusa malonica*)
苯甲酸	2苯甲酸$^-$→环己烷羧酸$^-$+3乙酸$^-$+HCO_3^-+3H^+	嗜酸营养互营菌(*Syntrophus aciditrophicus*)

非底物水平磷酸化发酵

某些底物不能释放足够的能量，不能直接通过底物水平磷酸化去偶联合成 ATP，

但是这些化合物仍然支持菌体的生长。在此情况下，底物的分解代谢与离子泵相连，从而建立起质子或钠的跨膜梯度。其实例包括温和生丙酸菌（*Propionigenium modestum*）和产甲酸草酸杆菌（*Oxalobacter formigenes*），这两种菌将二羧酸的发酵与结合于膜上的产能离子泵相偶联。

温和生丙酸菌进行如下反应：

$$\text{琥珀酸}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{丙酸}^{-} + HCO_3^{-} \qquad \Delta G^{0'} = -20.5\text{kJ}$$

总反应所产生的自由能不足以直接通过底物水平磷酸化与 ATP 的合成相偶联，但是它却作为唯一的产能反应支持菌体的生长。这可能是由于温和生丙酸菌对琥珀酸的脱羧作用（通过甲基丙二酰辅酶 A 以及膜结合的脱羧酶）与跨细胞质膜钠（Na^+）的外排相偶联（图 17.52a），位于 *P. modestum* 膜内的一种 Na^+ 转移 ATPase 利用 Na^+ 的这种梯度驱动 ATP 合成（图 17.52a）。

产甲酸草酸杆菌进行的草酸发酵反应如下：

$$\text{草酸}^{2-} + H_2O \rightarrow \text{甲酸}^{-} + HCO_3^{-} \qquad \Delta G^{0'} = -26.7\text{kJ}$$

在中性 pH 条件下，草酸以离子形式即草酸$^{2-}$存在，通过脱羧形成甲酸$^{-}$消耗 1 个质子。随后，甲酸运出细胞外，这样就建立起 1 个质子动力，能够通过位于膜上的质子转移 ATPase 与 ATP 的合成相偶联（图 17.52b）。

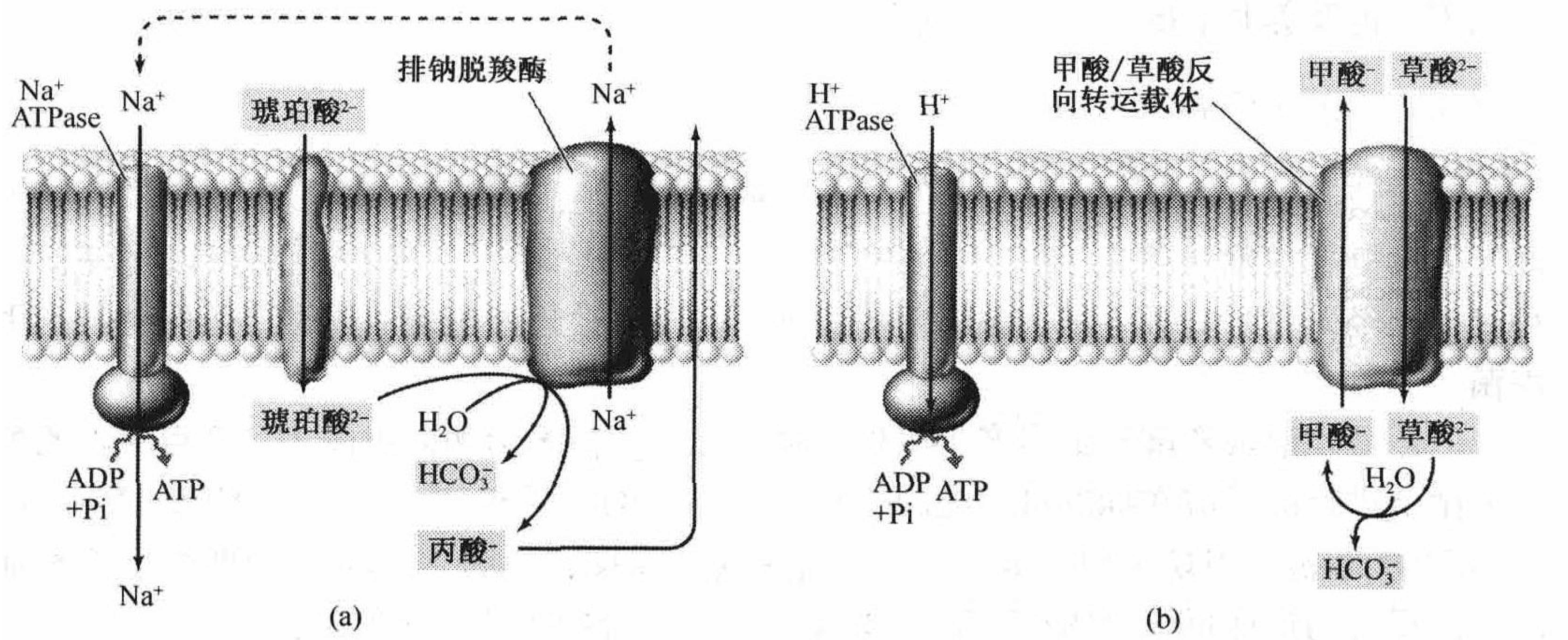


图 17.52　琥珀酸和草酸的独特发酵。（a）温和生丙酸菌（*Propionigenium modestum*）的琥珀酸发酵。钠转移 ATPase 合成 ATP，钠的排出与琥珀酸脱羧所释放的能量相偶联。（b）产甲酸草酸杆菌（*Oxalobacter formigenes*）的草酸发酵，草酸的输入和甲酸的输出由甲酸-草酸反向转运载体消耗质子来完成。ATP 的合成与质子驱动的 ATPase 相偶联，给定反应的所有底物和产物以对比色显示。

生丙酸菌和产甲酸草酸杆菌这两种菌发酵的有趣并且独特之处是 ATP 的合成均是在没有底物水平磷酸化或电子传递过程下进行的，尽管如此，由于两种菌存在与有机酸

脱羧相偶联的 Na^+ 或 H^+ 泵，仍可以通过化学渗透合成 ATP。因此，这两种菌使我们在生物能学上得到一个重要启示：任何一个产能少于 31.8kJ（合成一个 ATP 所需的能量，表 17.6）的反应，均不能被排除是一个支持细菌生长的化学反应，如果该反应能够与离子梯度相偶联，就有产生 ATP 的可能性。然而，因为通过与膜结合的 ATPase 去驱动 ATP 的合成需要流入大约 $3H^+$（或 $3Na^+$），所以一个反应必须产生至少能泵出一个 H^+ 或 Na^+ 所需的能量，从理论上来讲才能支持菌体生长。

概念检查

各种各样的发酵过程已经被了解，在许多情况下，一种微生物的发酵产物被第二种微生物所发酵。一些发酵过程利用离子梯度（H^+ 或 Na^+）作为产能的基础。

◆ 琥珀酸发酵和草酸发酵的特殊之处是什么？

◆ 表 17.7 和表 17.8 所示的发酵的常见产物是脂肪酸，如乙酸，为什么这在能量上是重要的？

17.21 互养共栖

微生物学中有许多互养共栖（syntrophy）的例子，即两种不同的微生物共同降解一种底物并以此来储存能量，而任何一种微生物均不能单独降解该底物。在 19.10 节中我们将会了解到在厌氧分解代谢产生甲烷的过程中互养共栖是极其重要的原因，在这里我们来讨论互养共栖的微生物学和能量学。

互养反应中氢的消耗

多数情况下互养反应的核心是互养关系的一方产生 H_2 与另一方消耗 H_2 相偶联，因此互养共栖也被称为种间 H_2 转移（interspecies H_2 transfer）。H_2 消耗菌可以是任何一种我们已经研究过的微生物；包括反硝化细菌、硫酸盐还原细菌、同型产乙酸菌或产甲烷菌。

以乙醇发酵成乙酸与最终产生甲烷这种互养共栖情况为例。由图 17.53 可见，乙醇发酵菌所进行的反应在标准自由能的变化上是不利的（是正值），然而乙醇发酵菌所产生的 H_2 能够被产甲烷菌用作电子供体进行甲烷生成反应（图 17.53），当两个反应相加时，总反应为产能反应（图 17.53），并支持互养混合物中两种菌的生长。

互养共栖的另一个典型例子是，脂肪酸氧化互养共栖菌共养单胞菌（*Syntrophomonas*）（图 17.54）可将丁酸氧化为乙酸加上 H_2：

$$\text{丁酸}^- + 2H_2O \longrightarrow 2\,\text{乙酸}^- + H^+ + 2H_2 \qquad \Delta G^{0'} = +48.2\text{kJ}$$

该反应从自由能变化上来看相当不利，因此共养单胞菌不能利用丁酸进行纯培养生长。但是，如果反应所产生的 H_2 被一种互养伙伴微生物（如产甲烷菌）消耗，那么与 H_2 消耗菌共同培养时，共养单胞菌就会旺盛生长。

乙醇发酵：

$$2\ CH_3CH_2OH + 2\ H_2O \rightarrow 4\ H_2 + 2\ CH_3COO^- + 2\ H^+$$
$$\Delta G^{0\prime} = +19.4\ \text{kJ/反应}$$

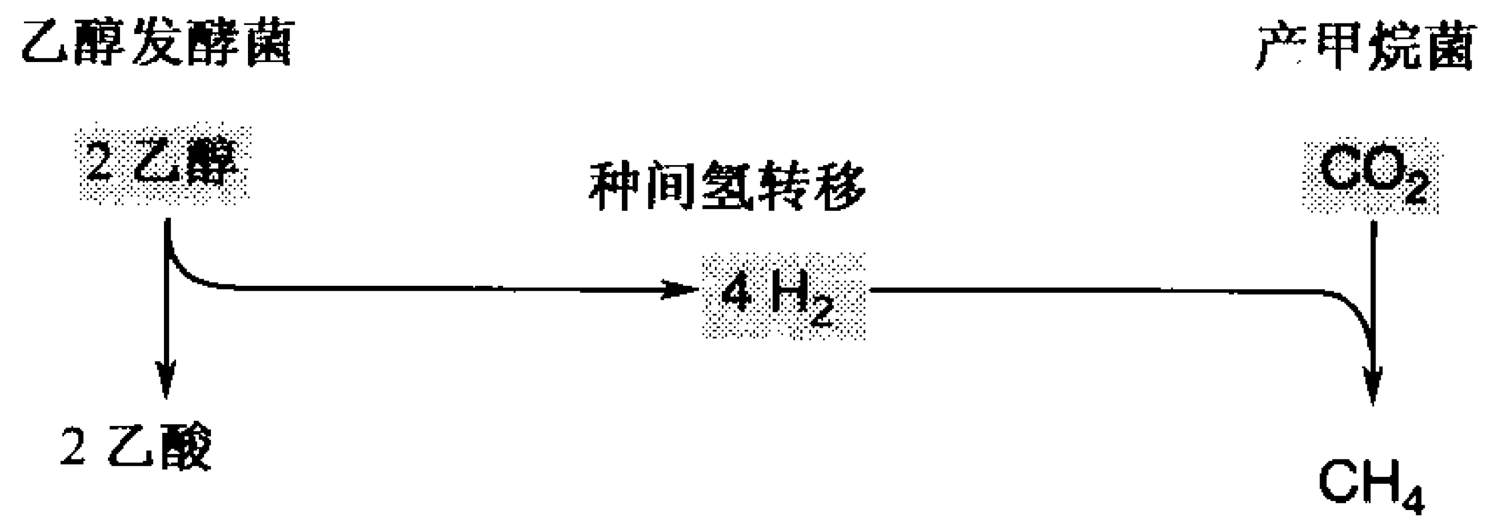
产甲烷作用：

$$4\ H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$$
$$\Delta G^{0\prime} = -130.7\ \text{kJ/反应}$$

耦合反应：

$$2\ CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\ CH_3COO^- + 2\ H^+$$
$$\Delta G^{0\prime} = -111.3\ \text{kJ/反应}$$

(a) 反应



(b) H_2的互养转移

图 17.53 种间 H_2 转移。一种乙醇氧化细菌与一种消耗 H_2 的细菌（此处为产甲烷菌）互养联合将乙醇发酵为甲烷和乙酸。(a) 涉及的反应，两种菌共享在耦合的反应中释放的能量。(b) H_2 互养转移的本质。

自由能变化值是正值的化学反应是如何能够支持微生物生长的呢？现在我们就来解开这个谜团。

互养共栖的能量学

如果只有当 H_2 被具有互养关系的一种微生物除去后，另一种微生物才能进行生长的话，那么除去 H_2 这一过程肯定会明显地影响反应的能量学。这是如何来影响的呢？附录Ⅰ中简单地概括了自由能的原理，说明一个反应中反应物和产物的真实浓度可以显著地改变一个反应的能量学，这是因为 $\Delta G^{0\prime}$ 是根据标准条件，即 1mol 浓度的产物和反应物来计算的，而 ΔG 是根据产物和反应物的实际浓度来计算的。

在无氧生境中，由于 H_2 是厌氧呼吸的一种很强的电子供体，因此 H_2 会被立即消耗，从而使 H_2 的浓度维持在很低的水平，一般低于 10^{-4} atm（表 19.4）。如果 H_2 的浓度非常低，并且以 ΔG 来计算反应的能量学的话（如何计算 ΔG 见附录Ⅰ），那么与乙醇或脂肪酸等物质氧化为乙酸和 H_2 相关的自由能变化值则变成放能型。例如，如果通过一种耗 H_2 互养微生物的活动使 H_2 的浓度维持在极低的水平，那么共养单胞菌氧化丁酸时自由能变化值为 −18kJ。

互养共栖菌产生 ATP 涉及底物水平磷酸化和氧化磷酸化两种机制，依据微生物的生长方式而定。底物水平磷酸化可以在乙酰辅酶 A（由乙醇或脂肪酸的 β 氧化产生）转化为乙酸（图 17.54a）的过程中进行，这可能是互养条件下产生 ATP 的唯一方式。尽管如此，由于共养单胞菌能够通过不饱和脂肪酸的歧化作用在纯培养条件下生长，因此

共养单胞菌也能够进行厌氧呼吸。例如，巴豆酸通过一部分被氧化成乙酸，一部分被还原成丁酸（图 17.54b）的方式支持共养单胞菌的生长，巴豆酸被共养单胞菌还原，它与质子动力的形成和 ATP 的合成相偶联，这与利用有机电子受体进行的其他厌氧呼吸[如延胡索酸还原成琥珀酸（见 17.18 节）] 类似。

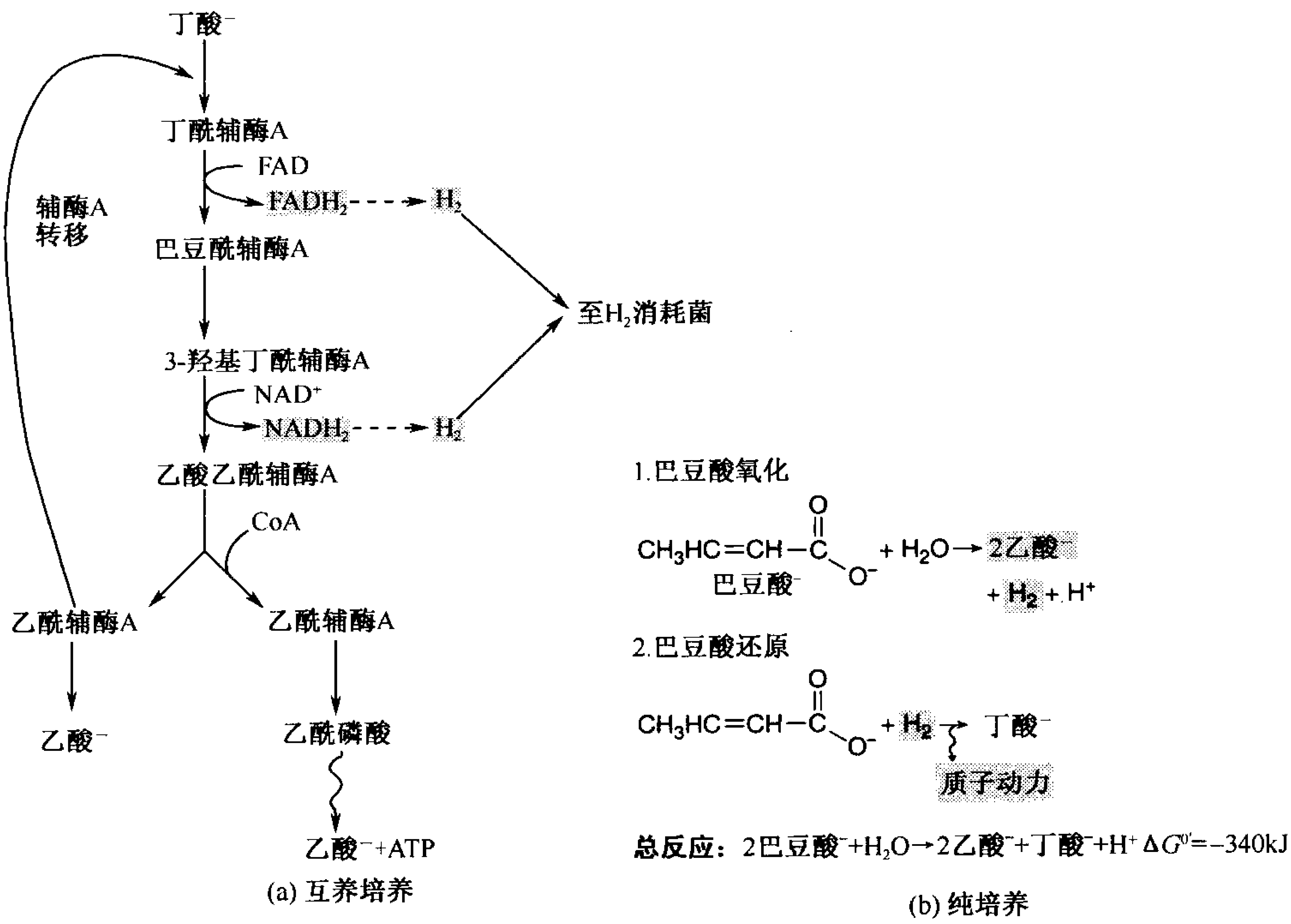


图 17.54 沃氏共养单胞菌（*Syntrophomonas wolfei*）互养培养和纯培养时生长的能量学。（a）互养培养时，生长取决于消耗 H_2的生物（如产甲烷菌），氢的产生可能涉及质子动力驱动的反向电子流（见 17.4 节），因为 FAD/$FADH_2$或 NAD^+/NADH 的 E_0' 比 $2H^+/H_2$的 E_0' 正电性更强（图 5.9）。（b）纯培养中，能量的产生与巴豆酸还原为丁酸相偶联。

在互养条件下不管 ATP 是如何产生的，对以该模式生长的共养单胞菌来说存在着额外的能量负担，因为共养单胞菌必须利用正电性更强的电子供体，如 $FADH_2$和 $NADH_2$（图 17.54a），以某种方式产生 H_2，这表明可能需要一部分产生的 ATP 去驱动反向电子流反应（见 17.5 节）来产生 H_2。显然，至少从能量学的观点来看，互养共栖型的乙醇和脂肪酸氧化细菌生活在生存的边缘。的确，即便是在共培养的条件下，从互养共栖反应中得到的能量可能仅有几千焦耳。

互养共栖细菌在生态上是碳循环的关键环节。这些微生物通过进化能够利用初级发酵者的发酵产物，还能够与其他厌氧菌协作，为它们提供一种必需的底物——H_2。相反，对好氧微生物来说，互养共栖并不必要，因为以 O_2为电子受体时反应的能量学与发酵代谢同一底物时的相比要有利得多。因此，互养共栖关系是无氧转化的标志，在互养共栖过程中可利用的能量很少，互养共栖微生物非常擅长利用在能量上处于边界的反应。

概念检查

互养共栖指两种微生物共同合作降解某种化合物，而任何一种微生物均不能单独降解该化合物。该过程通常为一种微生物产生 H_2，另一种微生物消耗 H_2。H_2的消耗能够影响 H_2产生菌所进行的反应的能量学，从而允许其产生 ATP，否则不能产生 ATP。

◆ 举出一个互养共栖的例子。为什么可以说在该例子中两种微生物均可受益？

◆ 预测一下在如图 17.53 所示的乙醇的互养共栖降解过程中产生多少 ATP。

◆ 脂肪酸氧化互养共栖菌能够进行纯培养生长吗？举出一个例子，并说明在纯培养条件下该微生物如何产生 ATP。

V 碳氢化合物的氧化和 O_2 在有机化合物分解代谢中的作用

碳氢化合物在地球上蕴藏量丰富，是多种化能有机营养生物的极好底物。尽管如此，我们将会了解到碳氢化合物的好氧降解存在着特殊的生化问题，另外，我们还会简要讨论多糖、脂类和几种其他物质的好氧降解，将其作为代谢多样性的另外的例子。首先我们来探讨一下一些降解反应对 O_2的需求情况。

17.22 氧分子（O_2）在生化反应中作为反应物

我们已经讨论了 O_2在产能反应中作为电子受体的作用（见 5.11 节）。尽管到目前为止这是 O_2在细胞代谢中最重要的作用，但是 O_2另一个有意思而且也是重要的作用就是在某些合成代谢和分解代谢过程中直接作为反应物。

加氧酶

加氧酶（oxygenase）是催化 O_2中的氧结合到有机化合物中的酶。存在两种加氧酶：一种是双加氧酶（dioxygenase），它催化 O_2中的两个氧原子均加入到有机化合物分子中；另一种是单加氧酶（monooxygenase），它只催化 O_2中两个氧原子中的一个氧原子转移到有机化合物中，另一个氧原子被还原成 H_2O。对大多数单加氧酶来说，电子供体是 NADH 或 NADPH，不过，是通过一种被 NADH 或 NADPH 供体还原的黄素蛋白（图 17.55）与 O_2直接偶联。对于前面所讨论过的氨单加氧酶（见 17.12 节），其电子供体是细胞色素 c。

在活体中，有几类反应需要 O_2作为反应物，一个极好的例子就是在固醇的生物合成中 O_2的参与。闭合固醇环系统的形成需要有分子氧的参加（图 4.18），很明显，这一反应不会在厌氧条件下进行，所以在厌氧条件下生长的微生物必须免去该反应或者从环境中获取所需的物质（固醇）。生物合成中对 O_2的需求具有重要的进化意义，这是由于在生命开始进化时地球的大气层中起初不含有 O_2，只是在进化出蓝细菌后才可以得到 O_2（见第 11 章）。

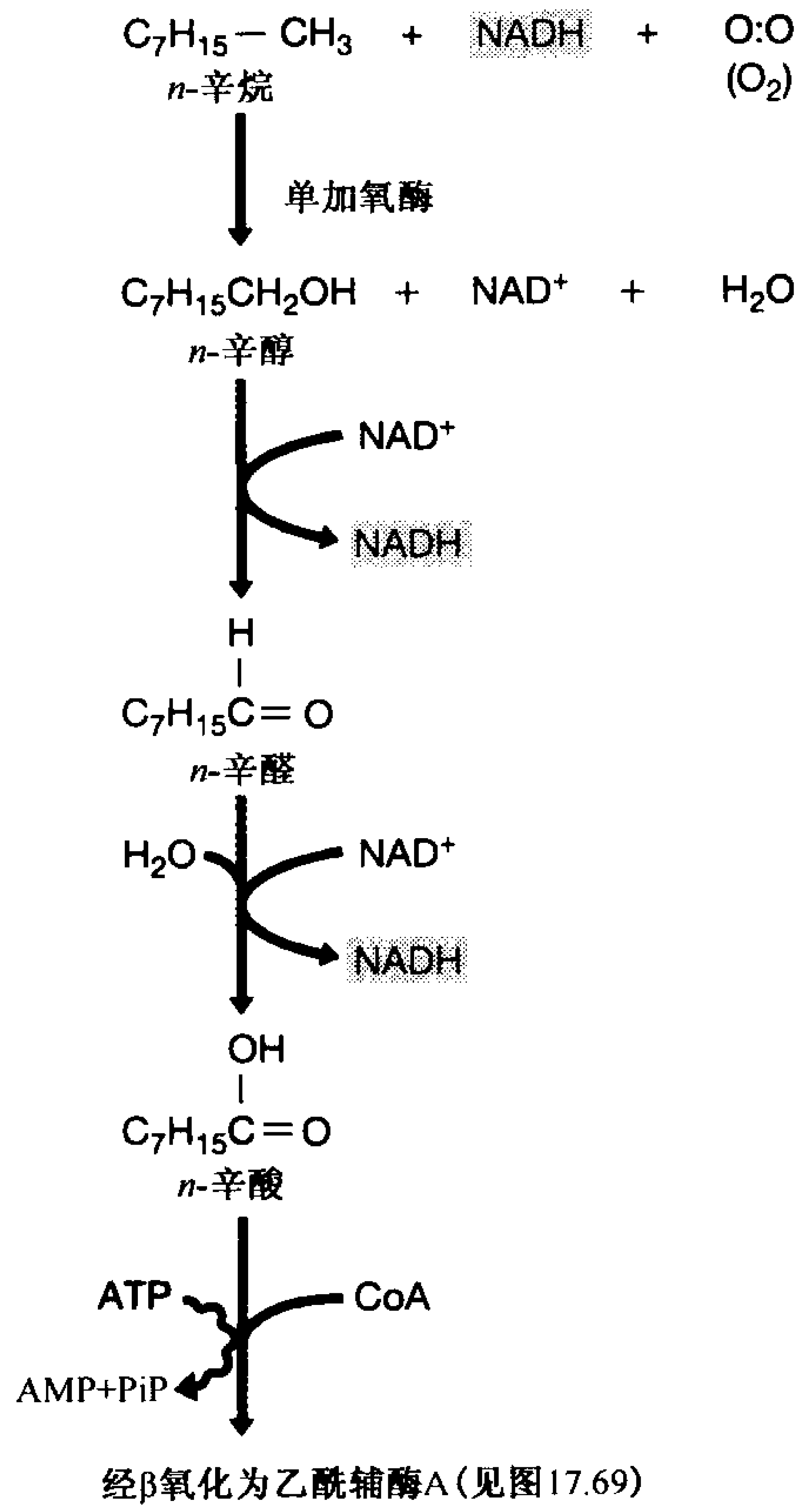


图 17.55　单加氧酶的活性。一种脂肪族碳氢化合物的氧化步骤，第一步由单加氧酶催化。一些硫酸盐还原菌和反硝化菌能够在无氧条件下降解脂肪族碳氢化合物。

概念检查

O_2除了作为电子受体外，还可以在某些生化过程中作为化学反应物。加氧酶催化O_2结合到生化化合物中。

◆ 如何从功能上区别单加氧酶与双加氧酶？

17.23 碳氢化合物的氧化

碳氢化合物是只含有碳和氢的有机化合物，极不溶于水。低分子质量的碳氢化合物是气态，而高分子质量的碳氢化合物在室温下为液态或固态。在脂肪族（aliphatic）碳氢化合物中，碳原子以开链形式结合，由于链的长度、链的分支度及双键数目的不同，脂肪族碳氢化合物存在大量不同的种类。芳香族碳氢化合物（芳香烃）含有芳香环，可以被看作是苯的衍生物（图 17.56）。

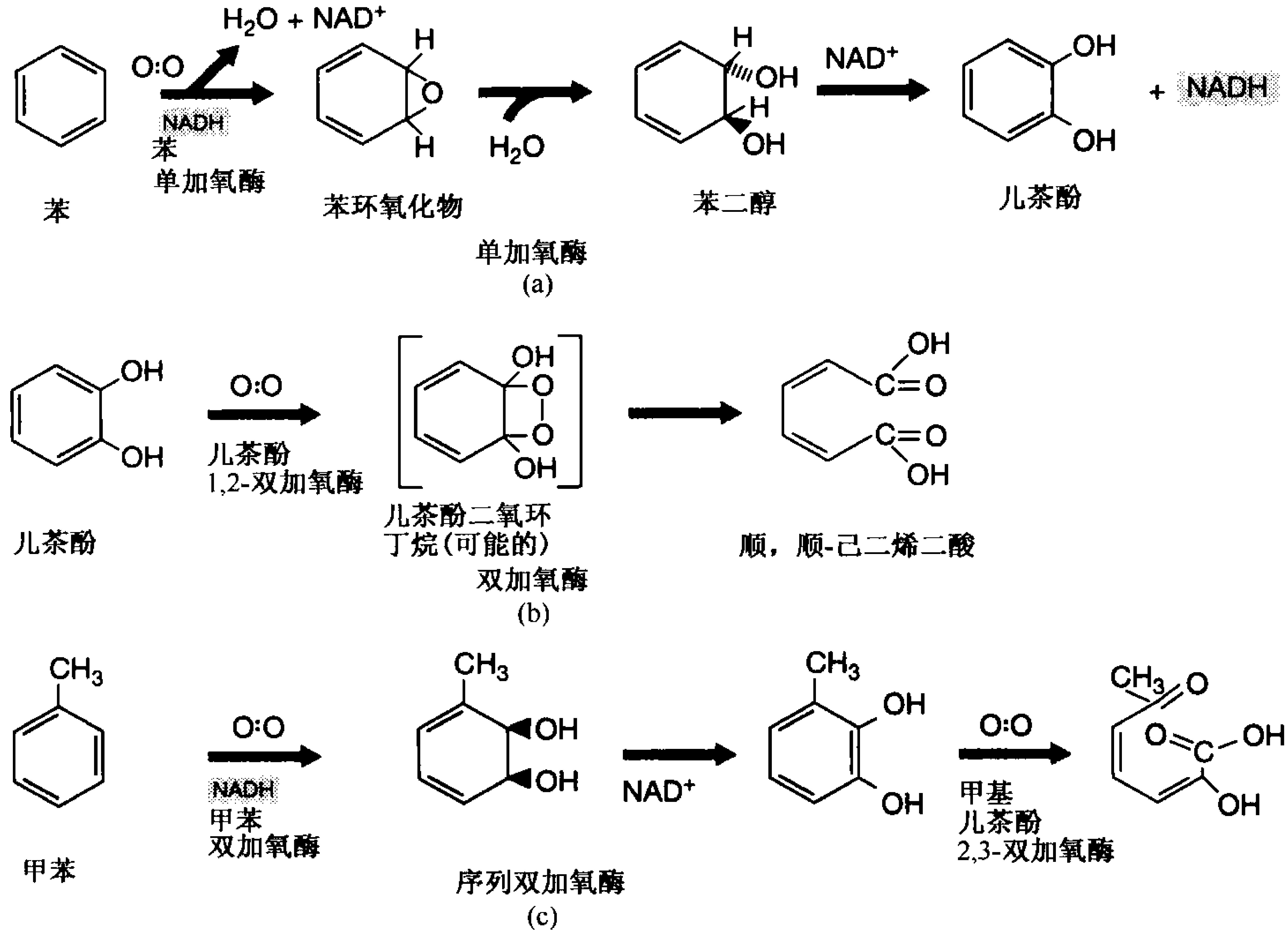


图 17.56　加氧酶在芳香族化合物分解代谢中的作用。（a）在单加氧酶作用下以 NADH 作为电子供体，苯被羟基化生成儿茶酚。（b）在双加氧酶作用下，儿茶酚裂解成顺，顺-己二烯二酸，两个反应中反应物氧原子以颜色显示，以表明不同的机制。（c）甲苯双加氧酶和甲基儿茶酚2,3-双加氧酶在甲苯降解中的催化活性。不同酶所引入的氧原子用不同的颜色区分，儿茶酚和原儿茶酸是芳香化合物有氧分解代谢的通用中间体，原儿茶酸含有 1 个羧基（COO^-）取代了儿茶酚中的 1 个羟基（—OH）。

脂肪族碳氢化合物的代谢

许多细菌和几种霉菌与酵母在有氧条件下能够以碳氢化合物为电子供体进行生长。饱和脂肪族碳氢化合物的初始氧化步骤包括以分子氧（O_2）作为一种反应物，将氧分子中的一个原子结合到被氧化的碳氢化合物中，通常在末端碳原子处。该反应由单加氧酶来催化完成（见 17.22 节），典型的反应顺序如图 17.55 所示。序列反应的终产物为乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 在柠檬酸循环中被进一步分解代谢。

脂肪族碳氢化合物，包括饱和的和不饱和的，还能够被有限的几种反硝化细菌和硫酸盐还原菌在无氧条件下氧化成 CO_2，显然该过程不涉及单加氧酶。降解的机制包括碳氢化合物羧化（carboxylation，加入 CO_2）形成脂肪酸，随后通过 β 氧化［一种不需要 O_2的反应（图 17.69）］被进一步降解。

芳香烃

许多芳香烃可以在有氧的情况下被微生物用作电子供体，其中对于假单胞菌属（*Pseudomonas*）的细菌研究得最清楚。这些化合物（其中有些是相当大的分子）的代

谢途径通常是以形成儿茶酚或一种结构上与其相关的化合物作为起始步骤（图 17.56a）。

这些单环化合物被作为起始底物是因为只有当大分子的芳香烃转变为这些较简单的形式之后才能够进行氧化分解代谢。然后，原儿茶酸和儿茶酚可以被进一步降解成能够进入柠檬酸循环的化合物，即琥珀酸、乙酰辅酶 A 和丙酮酸（图 5.22）。芳香烃分解代谢的一些步骤通常需要加氧酶，图 17.56a、b 和 c 给出了 3 种不同的加氧酶催化的反应，其中一种利用单加氧酶，另外两种利用双加氧酶。

芳香族化合物的厌氧降解

如果芳香族化合物已经含有一个氧原子的话，还能够被兼性好氧细菌在厌氧条件下降解。这些酚类化合物能够被某些反硝化细菌、光养菌、Fe^{3+} 还原菌和硫酸盐还原菌所降解。从生物化学的观点来看，芳香烃化合物的厌氧分解代谢过程是通过还原性环断裂而不是氧化性环断裂而实现的（图 17.57）。整个厌氧分解代谢过程包括环的还原，继而是环的断裂并产生直链脂肪酸或二羧酸。这些中间物能够被转化为乙酰辅酶 A，用于生物合成和产能。苯甲酸及其衍生物为常见的天然产物，容易被厌氧降解。

苯、甲苯、缺少一个氧原子的芳香族化合物（其结构见图 17.56）也可以被厌氧降解。苯被某些反硝化细菌分解代谢，甲苯被某些三价铁还原菌、光养紫细菌和反硝化细菌分解代谢。在生化上，甲苯最终被转化为苯甲酸衍生物苯酰辅酶 A，然后可能会通过环的还原被进一步降解（图 17.57）。

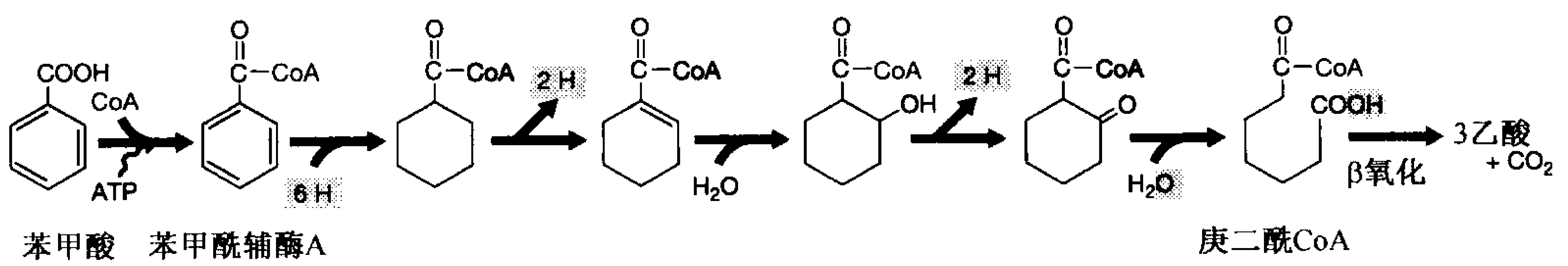


图 17.57 苯通过还原性环裂解进行无氧降解。 注意途径中所有的中间物都与辅酶 A 结合，产生的乙酸在三羧酸循环中被进一步分解代谢（见 5.13 节和图 5.22）。

概念检查

许多微生物都能降解脂肪烃和芳香烃，有氧分解代谢和加氧酶的作用相关，芳香族化合物的厌氧降解过程是通过还原途径而不是氧化途径。

◆ 绘出苯和苯甲酸的化学结构，这些化合物是脂肪族还是芳香族化合物？

◆ 比较芳香族化合物的厌氧降解和有氧代谢，它们之间存在的根本不同点是什么？请给出一个这方面的例子。

17.24 甲烷营养和甲基营养

12.6 节中讨论了甲烷营养菌（methanotroph）和甲基营养菌（methylotroph）碳代谢的特殊情形，尽管不是自养生物，但甲基营养菌利用 C_1 化合物（或其他缺少碳碳

键的有机化合物）进行能量代谢和生物合成。这里我们重点讨论该过程的生理学。

甲烷氧化的生化过程

甲烷氧化为二氧化碳的各个步骤可归纳如下：

$$CH_4 \rightarrow CH_3OH \rightarrow CH_2O \rightarrow HCOO^- \rightarrow CO_2$$

甲烷营养菌是指那些能够利用 CH_4 的甲基营养菌（见 12.6 节）。甲烷营养菌能够在甲醛（CH_2O）水平上同化它们的全部或一半碳原子（依赖于它们所利用的途径）。我们将会看到，与自养生物相比这种方式将会影响许多能量的储存，因为在自养生物中碳从氧化态更高的 CO_2 被同化。但是这里我们侧重于能量的储存。

甲烷在有氧条件下氧化的起始步骤与一种叫做甲烷单加氧酶（methane monooxygenase）的酶有关。正如我们在 17.22 节中讨论过的那样，加氧酶催化 O_2 中的氧与碳化合物（以及一些氮化合物，见 17.12 节）结合，并且似乎在碳氢化合物的代谢中被广泛运用。单加氧酶将 O_2 中的 1 个氧原子结合到底物中，另 1 个氧原子则被还原为水。甲烷营养菌甲基弯菌（*Methylosinus*）的甲烷氧化过程已经被详细研究过，在甲烷氧化为甲醇的过程中，所需的电子来源于细胞色素 c（图 17.58），这种对还原力的需求阻止了 ATP 的合成。与此相吻合，甲烷营养菌不管以甲烷还是以甲醇为生长基质时其生长量（每消耗 1mol 底物所产生的细胞克数）是相同的。

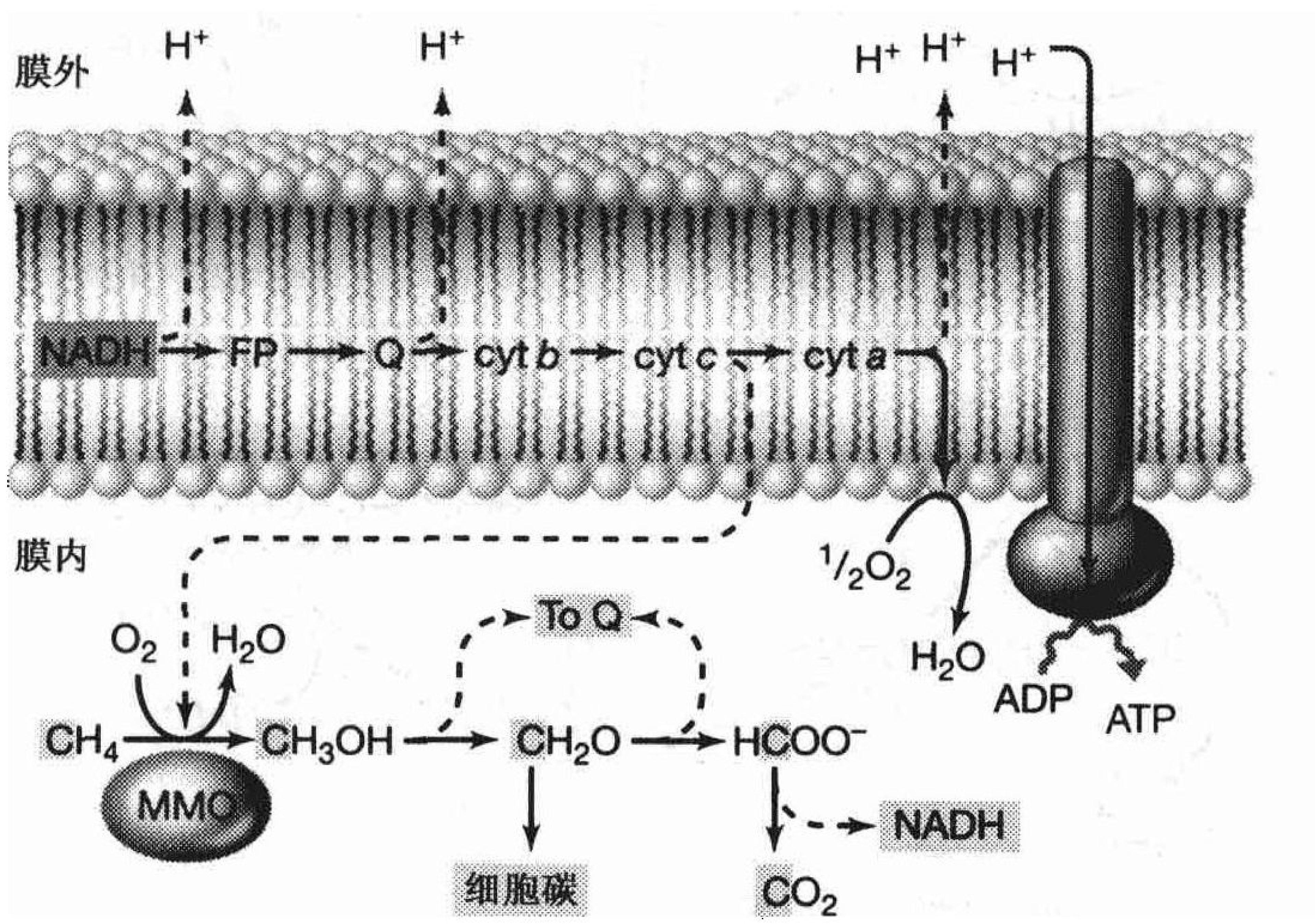


图 17.58 甲烷营养细菌对甲烷的氧化。甲烷（CH_4）在甲烷单加氧酶的作用下转变为甲醇（CH_3OH），驱动该第一步反应所需的电子来源于细胞色素 c，该反应不储存能量。细胞膜内的电子流产生质子动力，供 ATPase 使用。注意用于生物合成的碳主要来自于甲醛（CH_2O）。MMO：甲烷单加氧酶；FP：黄素蛋白；cyt：细胞色素；Q：醌。尽管没有特别说明，但是甲烷单加氧酶实际上是一种膜结合酶。

从甲醇到 CO_2 的其他氧化步骤利用了典型的氧化还原反应的辅助因子，如醌或 NADH，它们进入电子传递链，在电子传递过程中形成质子动力，产生 ATP（图 17.58）。

除了有氧分解代谢，甲烷也能够被无氧氧化。这是一个互养共栖过程，涉及硫酸盐还原细菌和产甲烷菌这两种严格厌氧菌的协作，作为伙伴微生物。我们将在 19.10 节探

讨这一过程。

C_1 同化为细胞物质

正如我们在 12.6 节中所述，已知有两种类型的甲烷营养菌，Ⅰ型和Ⅱ型。每一类型的成员都有许多共同的表型特征，不过在对 C_1 同化时却采用了不同的机制。

图 17.59 概括了丝氨酸途径（serine pathway）的全部过程，该途径由Ⅱ型甲烷营养菌所采用。在该途径中 1 分子的甲醛（由甲烷氧化所产生，图 17.58）和 1 分子的 CO_2 合成 1 个二碳单位——乙酰辅酶 A，每合成 1 个乙酰辅酶 A 分别需要 2 分子的还原力 NADH 和 2 分子的能量 ATP。丝氨酸途径需要用到柠檬酸循环中的许多酶，丝氨酸转羟甲基酶（serine transhydroxymethylase）为该途径的特征酶（图 17.59）。

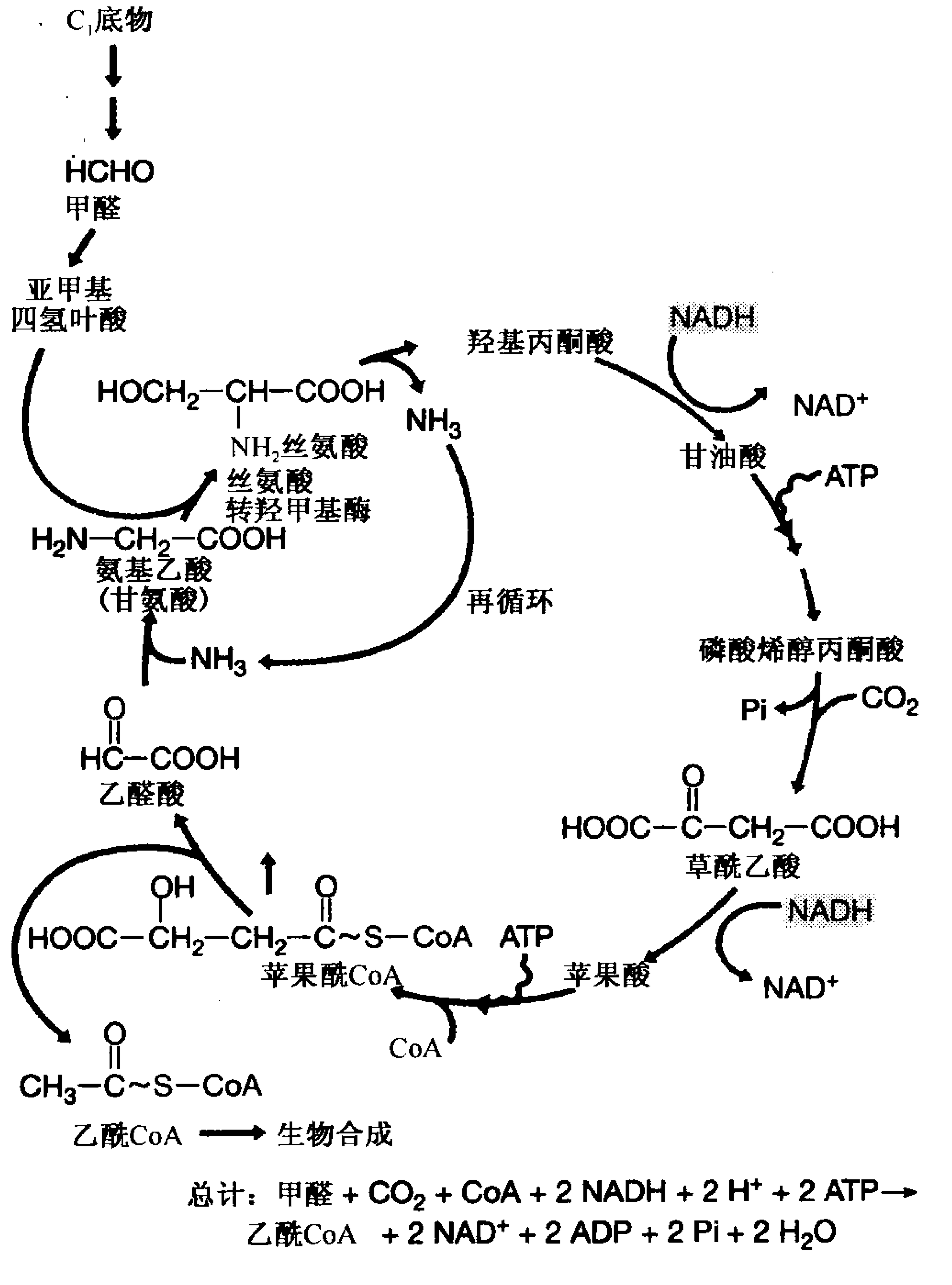
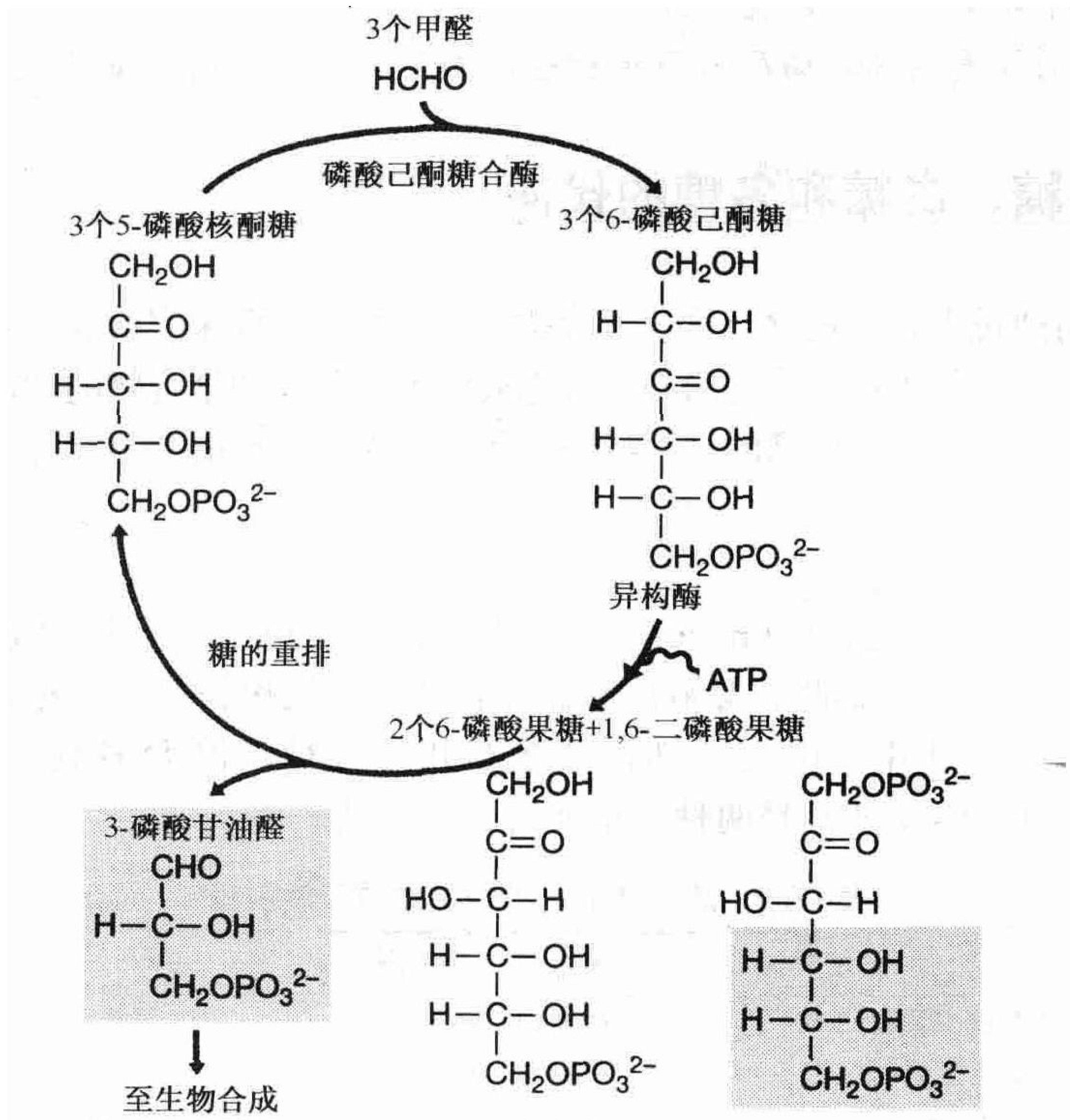


图 17.59 Ⅱ型甲烷营养细菌将 C_1 单位同化为细胞物质的丝氨酸途径。途径中的产物，乙酰辅酶 A 作为合成新的细胞物质的起点。丝氨酸转羟甲基酶为该途径的关键酶。

单磷酸核酮糖途径（ribulose monophosphate pathway），由Ⅰ型甲烷营养菌所采用，概括于图 17.60 中。比起丝氨酸途径，单磷酸核酮糖途径效率更高，因为该途径中形成细胞物质的所有碳原子均来自甲醛，而甲醛和细胞物质具有相同的氧化水平，所以

不需要还原力。在单磷酸核酮糖途径中，每合成 1 分子 3-磷酸甘油醛需要消耗 1 分子 ATP（图 17.60）。和该途径的低能量需求相一致，Ⅰ型甲烷营养菌其细胞产量（每氧化 1mol 甲烷所生成的细胞克数）比Ⅱ型的高。



总计：3甲醛 + ATP⟶3-磷酸甘油醛+ADP

图 17.60 同化一碳化合物的单磷酸核酮糖途径，发现于Ⅰ型甲烷营养细菌中。该己酮糖的全名为 6-磷酸 D-赤-L-丙三氧基-3-己酮糖（D-erythro-L-glycero-3-hexulose 6-phosphate）。完成该循环需要 3 个甲醛分子，净生成 1 分子的 3-磷酸甘油醛。磷酸己酮糖合酶为该途径的关键酶。糖的“重排”涉及磷酸戊糖途径中的酶（图 17.65）。

磷酸己酮糖合酶（hexulosephosphate synthase，能够将 1 分子甲醛和 1 分子 5-磷酸核酮糖缩合），以及 6-磷酸己酮糖异构酶（hexulose-6-P-isomerase）（图 17.60）为单磷酸核酮糖途径的特征酶。在许多不同的生物中，该途径中的其他酶与糖的重排相关。应该注意的是该途径起始反应的底物 5-磷酸核酮糖和卡尔文循环中的 C_1 受体 1，5-二磷酸核酮糖（ribulose 1，5-bisphosphate）很相似（见 17.6 节），这就表明这两个循环在进化中可能有相同的起源。

概念检查

甲烷营养是将甲烷作为碳源和能源。在甲烷的分解代谢中，甲烷单加氧酶为关键酶。在甲烷营养菌中 C_1 单位通过单磷酸核酮糖途径或丝氨酸途径在甲醛水平上被同化

为细胞物质。

◆ 单磷酸核酮糖途径需要的能量和还原力是什么？丝氨酸途径的能量和还原力又是什么？它们为什么不同？

◆ 为什么甲烷氧化为甲醇需要还原力？

◆ 卡尔文循环途径和单磷酸核酮糖途径，哪个途径需要的能量输入更多？为什么？

17.25 己糖、戊糖和多糖的代谢

下面我们将通过考查有机化合物分解代谢的一些特殊方面来完成我们对化能有机营养代谢的讨论，特别是关于在产能之前必须首先被水解成单体的聚合物的利用方面。我们还将考查细胞用于产生和分解戊糖的一个特殊途径。首先从多糖的微生物降解开始讨论。

己糖和多糖的利用

6个碳原子的糖称为己糖（hexose），是许多化能有机营养生物的最重要的电子供体，也是微生物细胞壁、荚膜、黏液层和储存物的重要结构物质。自然界中最常见的己糖的来源列于表17.9中，由表可知，虽然有几种二糖，但大多数为多糖，纤维素（cellulose）和淀粉（starch）是两种最重要的天然多糖。

表 17.9 能够产生己糖和戊糖的天然多糖[a]

物质	组成	来源	分解酶
纤维素	葡萄糖多聚物(β-1,4-)	植物(叶、茎)	纤维素酶(β-1,4-葡聚糖酶)
淀粉	葡萄糖多聚物(α-1,4-)	植物(叶,种子)	淀粉酶
糖原	葡萄糖多聚物(α-1,4-和α-1,6-)	动物(肌肉)	淀粉酶(磷酸化酶)
昆布多糖	葡萄糖多聚物(β-1,3-)	海洋藻类(褐藻门)	β-1,3-葡聚糖酶(昆布多糖酶)
裸藻淀粉	葡萄糖多聚物(β-1,3-)	藻类(裸藻和黄藻)	β-1,3-葡聚糖酶
琼脂	半乳糖和半乳糖醛酸多聚物	海洋藻类(红藻)	琼脂酶
几丁质	*N*-乙酰葡糖胺多聚物(β-1,4-)	真菌(细胞壁),昆虫(外骨骼)	几丁质酶
果胶	半乳糖醛酸多聚物(来自半乳糖)	植物(叶子、种子)	果胶酶(多聚半乳糖醛酸酶)
葡聚糖	葡萄糖多聚物	细菌的荚膜和黏液层	葡聚糖酶
木聚糖	木糖和其他糖的异型多聚物(β-1,4-和α-1,2-或α-1,3-侧链)	植物	木聚糖酶
蔗糖	葡萄糖-果糖二糖	植物(果实、蔬菜)	蔗糖酶
乳糖	葡萄糖-半乳糖二糖	牛奶	β-半乳糖苷酶

a. 每种物质都能够被微生物降解。

虽然纤维素与淀粉都是由葡萄糖单体构成，但是它们是以不同的方式连接起来的（表17.9，图3.6），不同的连接方式极大地影响了它们的特性。纤维素比起淀粉来更不容易溶解，而且通常不容易被消化。纤维素形成长的原纤维，经常会发现消化分解纤维素的微生物与其紧密结合在一起（图17.61）。许多真菌可以消化分解纤维素，这是森

林地表植物物质降解的主要原因。然而，能够消化分解纤维素的细菌却局限于相当少的几个属中，其中最常见的是滑动菌，如生孢噬纤维菌（*Sporocytophaga*）和噬纤维菌（*Cytophaga*）（图 17.61 和图 17.62；图 12.90），以及梭菌和放线菌。

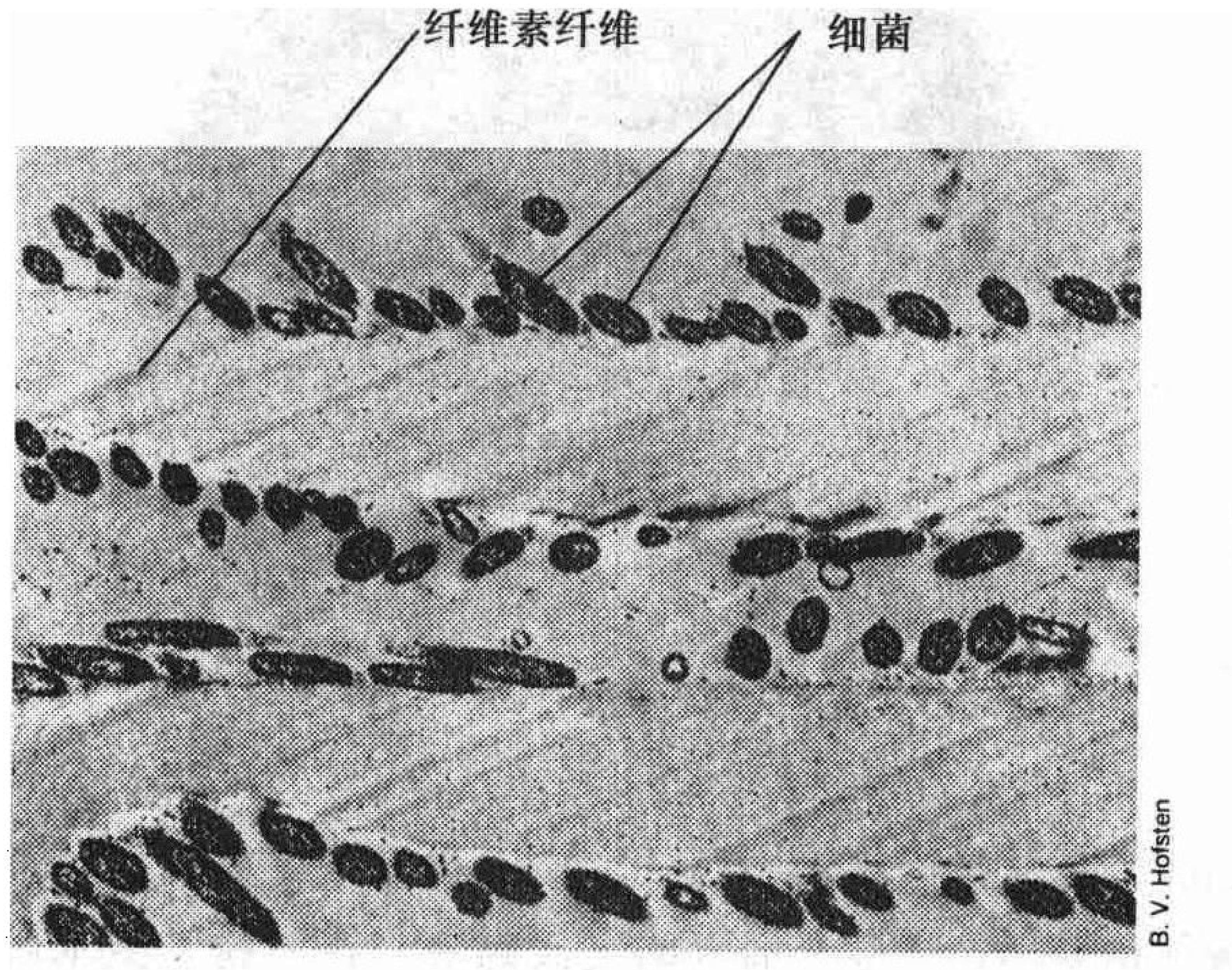


图 17.61　纤维素的降解。透射电镜照片显示纤维素降解菌——黏球生孢噬纤维菌（*Sporocytophaga myxococcoides*）吸附于纤维素的纤维上。细胞直径约 0.5μm（图 12.90）。

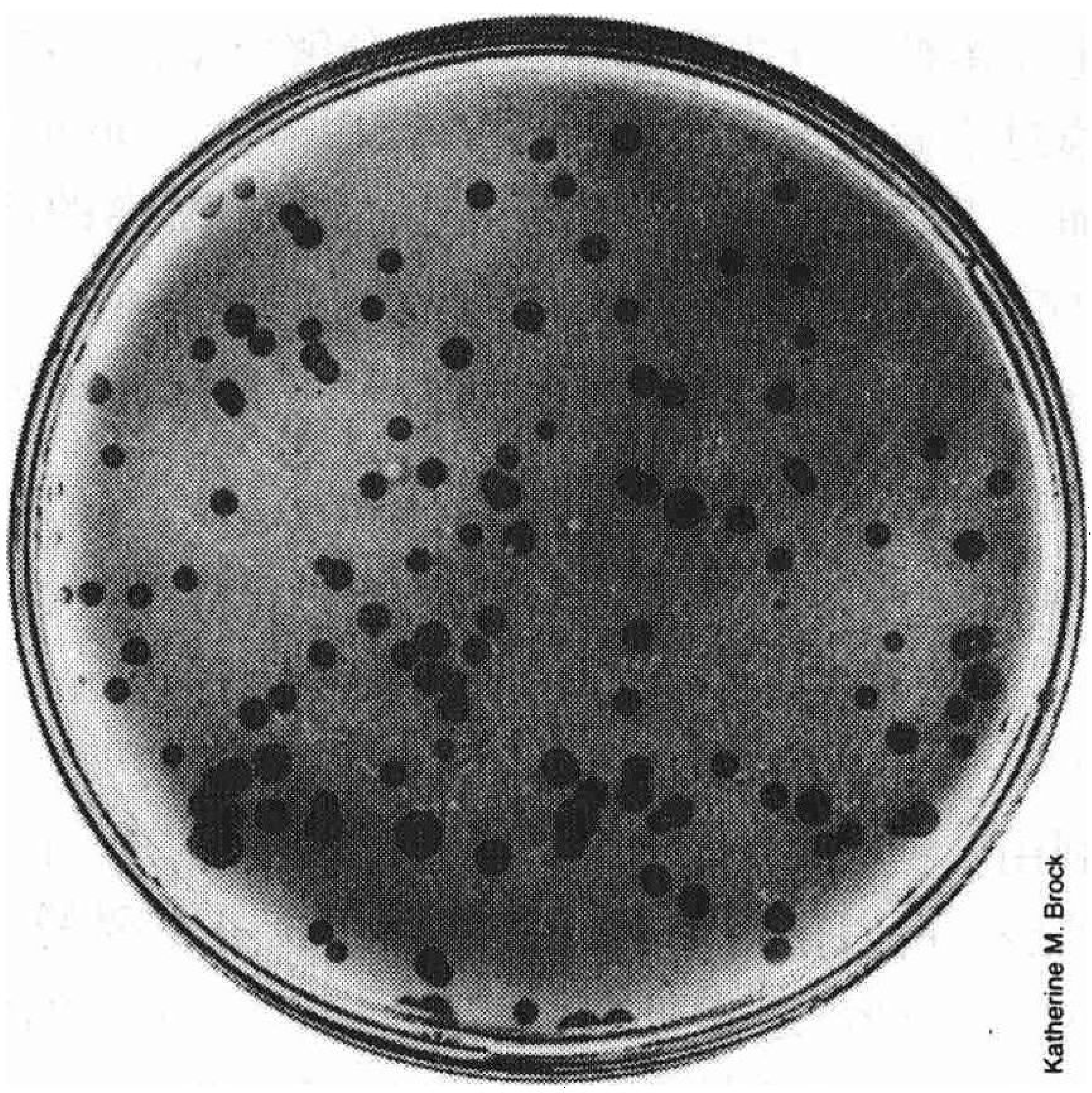


图 17.62　生长在纤维素琼脂平板上的哈氏噬纤维菌（*Cytophaga hutchinsonii*）的菌落。透明区域是纤维素被水解的地方。

有一些梭菌能够进行纤维素的厌氧降解，这些梭菌存在于湖泊的沉积物、动物的肠道及污水的厌氧分解系统中。纤维素的消化在反刍动物的瘤胃中也是一个主要的过程，在瘤胃内丝状杆菌（*Fibrobacter*）和瘤胃球菌（*Ruminococcus*）活跃地分解消化纤维素（见 19.11 节）。

淀粉被许多真菌和细菌降解，这可以从图 17.63 的培养实验中得到说明。淀粉分解酶被称为淀粉酶（amylase），在许多需要降解淀粉的工业领域中具有重要的实用价值，

如纺织、洗衣、造纸和食品工业。真菌和细菌是这些酶的商业来源（见 30.9 节）。

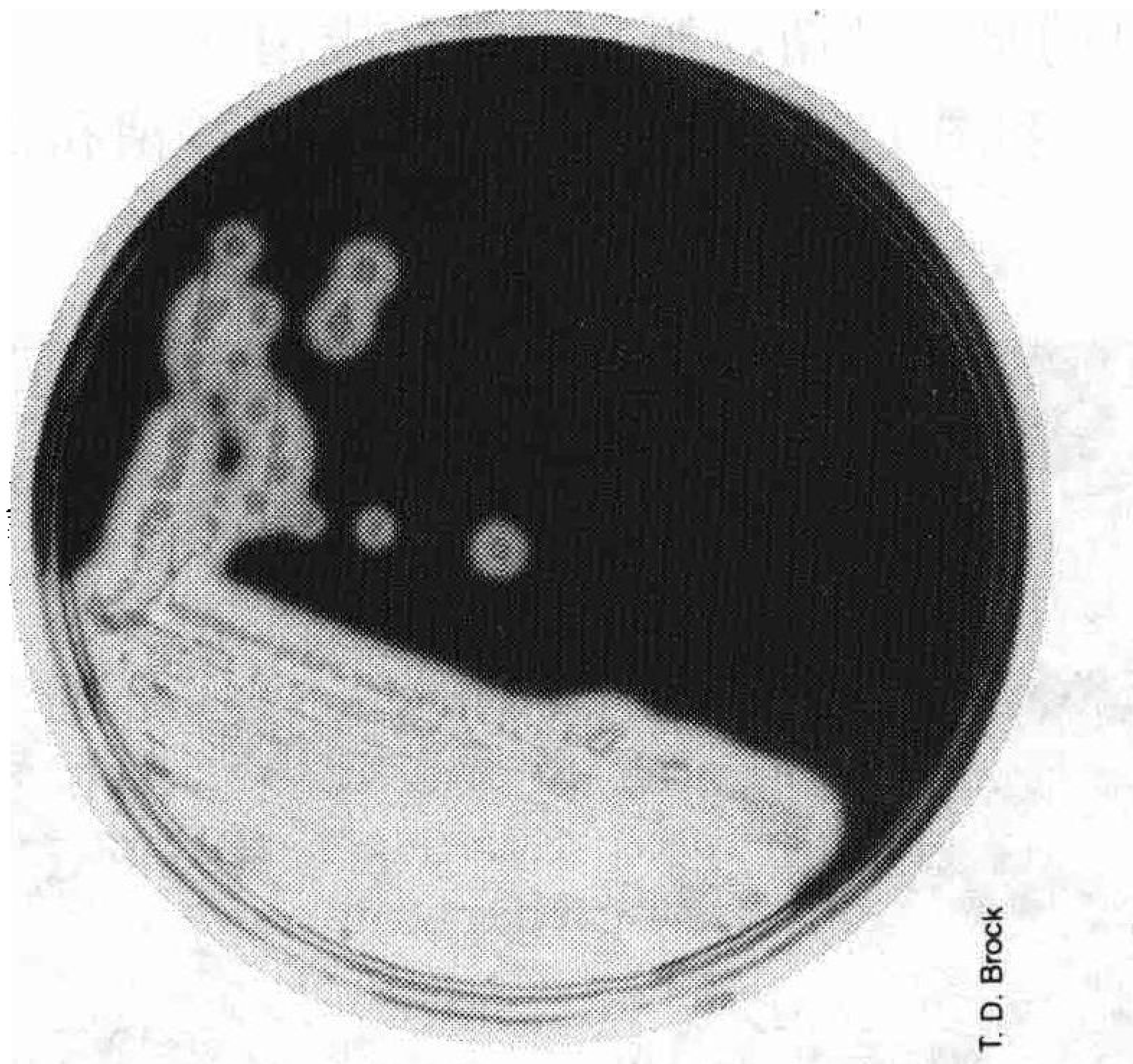


图 17.63 枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）菌落对淀粉水解的证明。菌体培养后，平板上加入路戈氏碘液，在淀粉发生水解作用的地方，淀粉-碘复合物的紫色特征就会消失。由于产生的胞外淀粉酶在培养基中扩散，淀粉的水解发生在离开菌落一段距离的地方。

所有用作底物的胞外多糖都首先通过水解作用分解成单体。相反，胞内作为储存物质形成的多糖并不是通过水解，而是通过磷酸解作用（phosphorolysis）被降解的。磷酸解作用的过程涉及加入无机磷酸，产生磷酸已糖而不是游离的己糖，淀粉-葡萄糖的 α-1,4多聚物的降解过程概括如下：

$$(C_6H_{12}O_6)_n + Pi \rightarrow (C_6H_{12}O_6)_{n-1} + 1\text{-磷酸葡萄糖}$$

由于1-磷酸葡萄糖比较容易转变为6-磷酸葡萄糖—— 一种糖酵解中的关键中间体（图 5.14），不需要消耗能量，因此对细胞来讲，磷酸解作用是一个储存能量的过程。

二糖

许多微生物能够利用二糖（disaccharide）生长（表 17.9）。由于乳酸化菌能够利用乳糖（lactose）产生乳酸，所以微生物对乳糖的利用具有重要的经济价值。蔗糖（sucrose）是高等植物的常见二糖，通常先在蔗糖酶（invertase）的作用下被水解为它的单糖组分（葡萄糖和果糖），然后单糖通过常规途径被代谢。纤维二糖（cellobiose）、β-1,4-双葡萄糖，是纤维素降解的主要产物，易被许多自身不能分解纤维素的细菌降解。

微生物多糖葡聚糖（dextran）是由一些微生物以蔗糖作为起始物，在葡聚糖蔗糖酶（dextransucrase）的作用下合成的：

$$n\,\text{蔗糖} \longrightarrow \underbrace{(\text{葡萄糖})_n}_{\text{葡聚糖}} + n\,\text{果糖}$$

肠膜明串珠菌（*Leuconostoc mesenteroides*）以及一些其他细菌就是按以上方式合成葡聚糖的，形成的多聚物以大量的黏液层或荚膜形式积累在细胞的周围（图 17.64）。由于葡聚糖的形成需要蔗糖，所以当细菌在含有葡萄糖或果糖的培养基上培养时，不会形

成葡聚糖。在自然界中，当含有葡聚糖或其他多糖荚膜的细胞死亡时，这些物质会再一次被发酵微生物或化能有机营养微生物所利用。

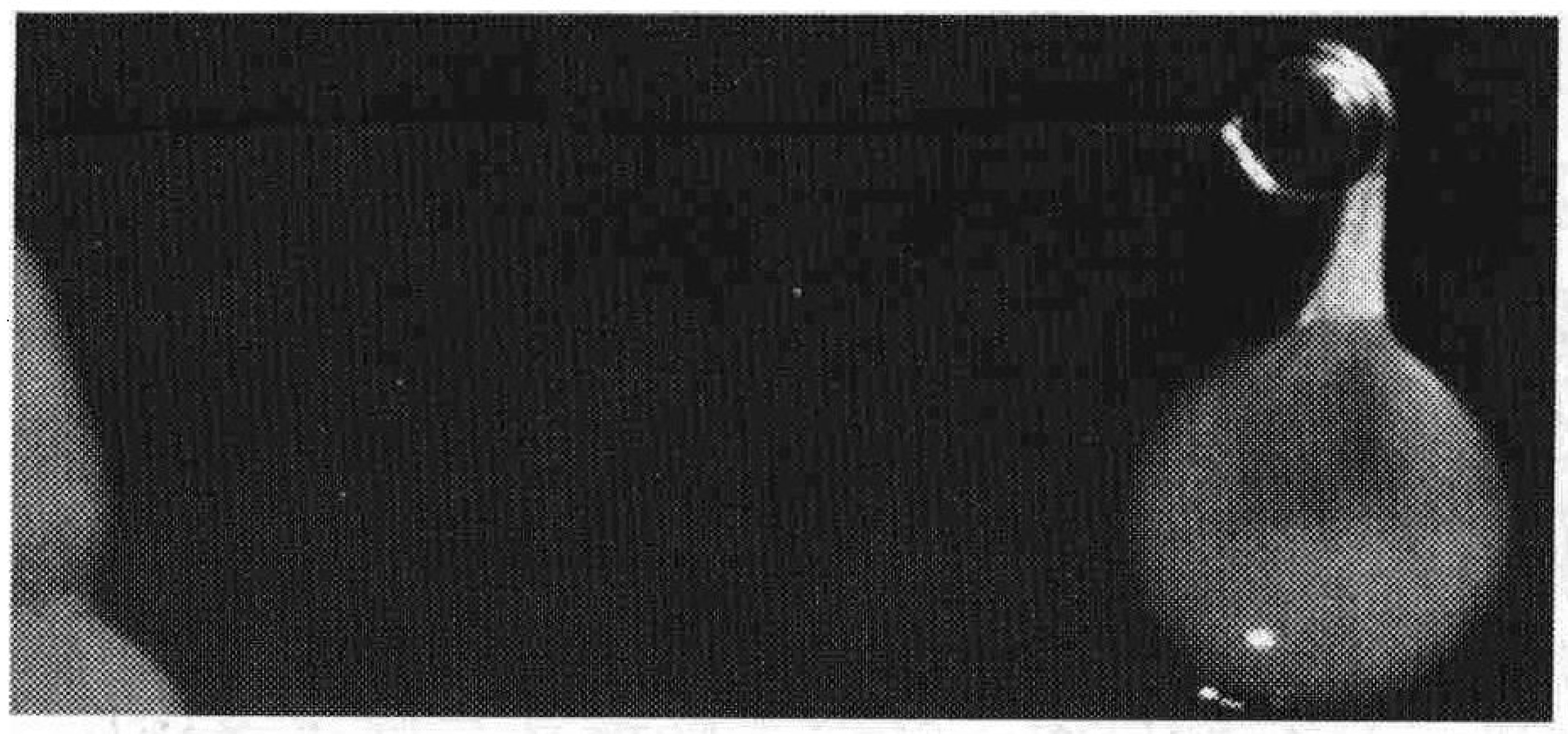


图 17.64　黏液的形成。葡聚糖产生菌——肠膜明串珠菌（*Leuconostoc mesenteroides*）在含有蔗糖的培养基上生长时形成的黏性菌落，当该菌生长在葡萄糖培养基上时，由于葡聚糖的合成需要蔗糖，形成的菌落既小又不黏稠（进一步的讨论见 21.3 节）。

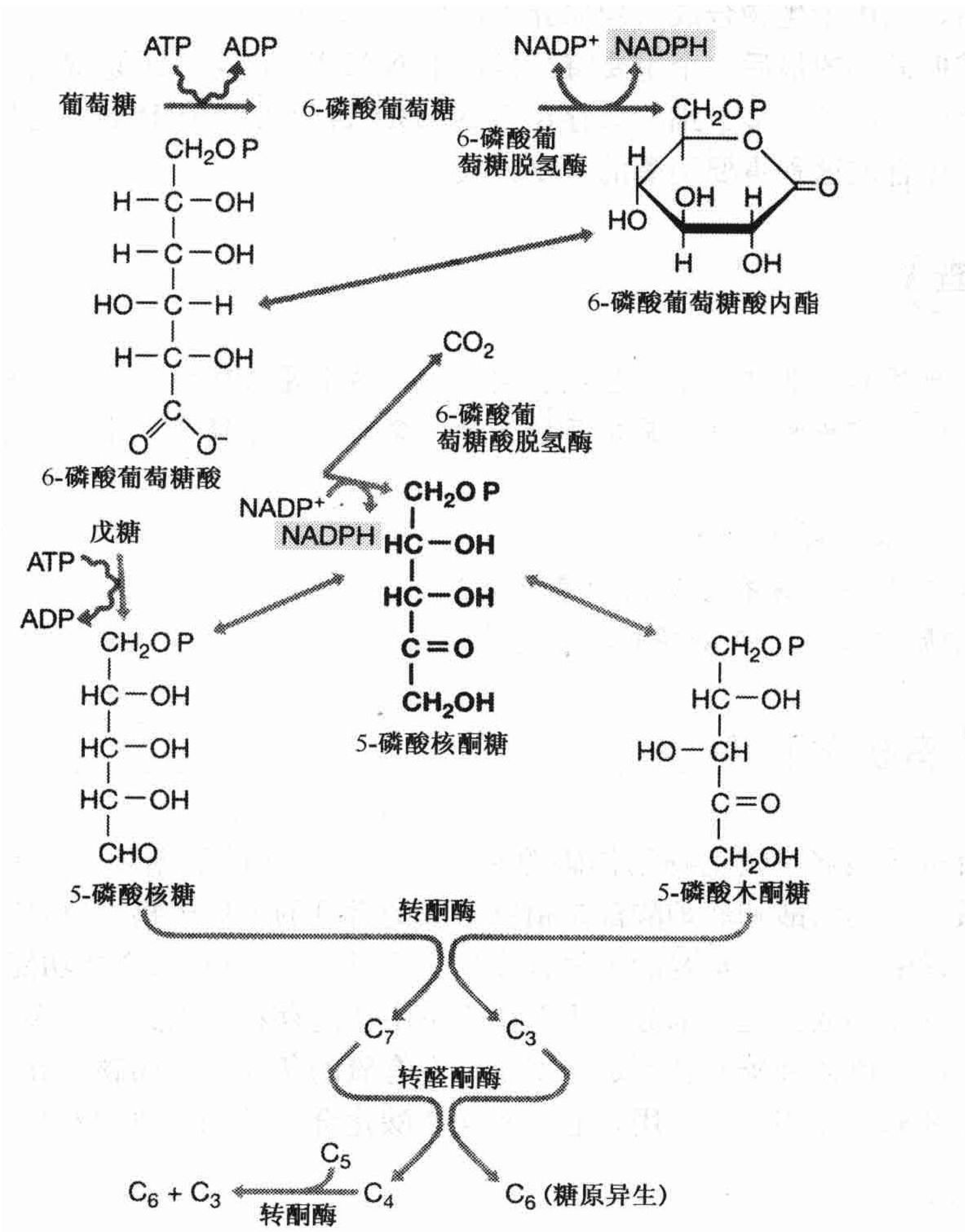


图 17.65　磷酸戊糖途径。该途径可用于①将己糖转化为戊糖；②将戊糖转化为己糖（糖原异生）；③分解代谢戊糖作为能源；④产生 NADPH。图中指出了该途径中的一些关键酶。

磷酸戊糖途径

戊糖通常能在自然界里获得，如果在自然界里无法获得戊糖，它们就必须被合成，因为它们是构成核酸的骨架。戊糖由己糖合成，该过程的主要途径为磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway）。

图 17.65 对磷酸戊糖途径进行了总结，在该途径中需要注意几个重要特征。第一，葡萄糖能够通过氧化以及脱羧作用失去 1 个碳原子转变为戊糖，该过程产生 NADPH 及途径中的关键中间体 5-磷酸核酮糖（图 17.65），5-磷酸核酮糖再转化为核糖（核糖再转化为脱氧核糖，见 5.16 节），为核酸合成提供原料。戊糖还能够作为电子供体进入磷酸戊糖途径，在被进一步分解代谢之前通常被磷酸化形成磷酸核糖或一个相关的化合物（图 17.65）。

磷酸戊糖途径的第二个重要特征是产生各种不同类型的糖，通过途径的辅助反应（图 17.65），形成许多糖衍生物——C_4、C_5、C_6 和 C_7。这使得戊糖最终形成己糖，用于分解代谢，或用于生物合成（糖原异生，见 5.15 节）。

磷酸戊糖途径的最后一个重要特征是产生 NADPH，这种还原型辅酶用于细胞内还原性生物合成。尽管大多数细胞都存在将 NADH 转化为 NADPH 的机制，但是磷酸戊糖途径是直接合成这种重要辅酶的主要方式。

概念检查

多糖在自然界中非常丰富而且能够被分解，通常通过磷酸解作用变成已糖或戊糖单体并用作能源。淀粉和纤维素是常见的多糖。磷酸戊糖途径是产生用于生物合成的戊糖的主要方式。

- ◆ 什么是磷酸解作用？
- ◆ 在自然界中普遍存在的双糖是什么？
- ◆ 在细胞中磷酸戊糖途径的功能是什么？

17.26 有机酸代谢

许多有机酸能够被微生物用作碳源和电子供体。柠檬酸循环中的有机酸，如柠檬酸、苹果酸、延胡索酸和琥珀酸都是植物形成的常见的天然产物，也是微生物的发酵产物。由于柠檬酸循环具有重要的生物合成功能（见 5.16 节）和产能功能（见 5.13 节），完整的柠檬酸循环或其主要部分几乎在微生物中普遍存在。因此，许多微生物能够利用这些酸作为电子供体和碳源就不足为奇了。在有氧的条件下，四碳、五碳和六碳酸能够在柠檬酸循环酶的作用下被利用，通过氧化磷酸化合成 ATP（见 17.19 节）。

乙醛酸循环

单独通过柠檬酸循环不能利用二碳酸和三碳酸作为碳源。这个循环只有在受体分子四碳酸，即草酰乙酸（oxalacetate）在每一轮都可以再生的条件下才能够继续，缺少任

何一种用于生物合成的碳化合物，该循环均不能完成（图 5.22）。

当利用乙酸时，用于维持循环进行的草酰乙酸通过乙醛酸循环（glyoxylate cycle）产生（图 17.66），这样命名是由于乙醛酸为该循环的关键中间体。这个循环由柠檬酸循环的大部分反应组成，另外还加入了两种酶：异柠檬酸裂合酶（isocitrate lyase），其作用是将异柠檬酸裂解成琥珀酸和乙醛酸；其次是苹果酸合酶（malate synthase），可将乙醛酸和乙酰辅酶 A 转变为苹果酸（图 17.66）。

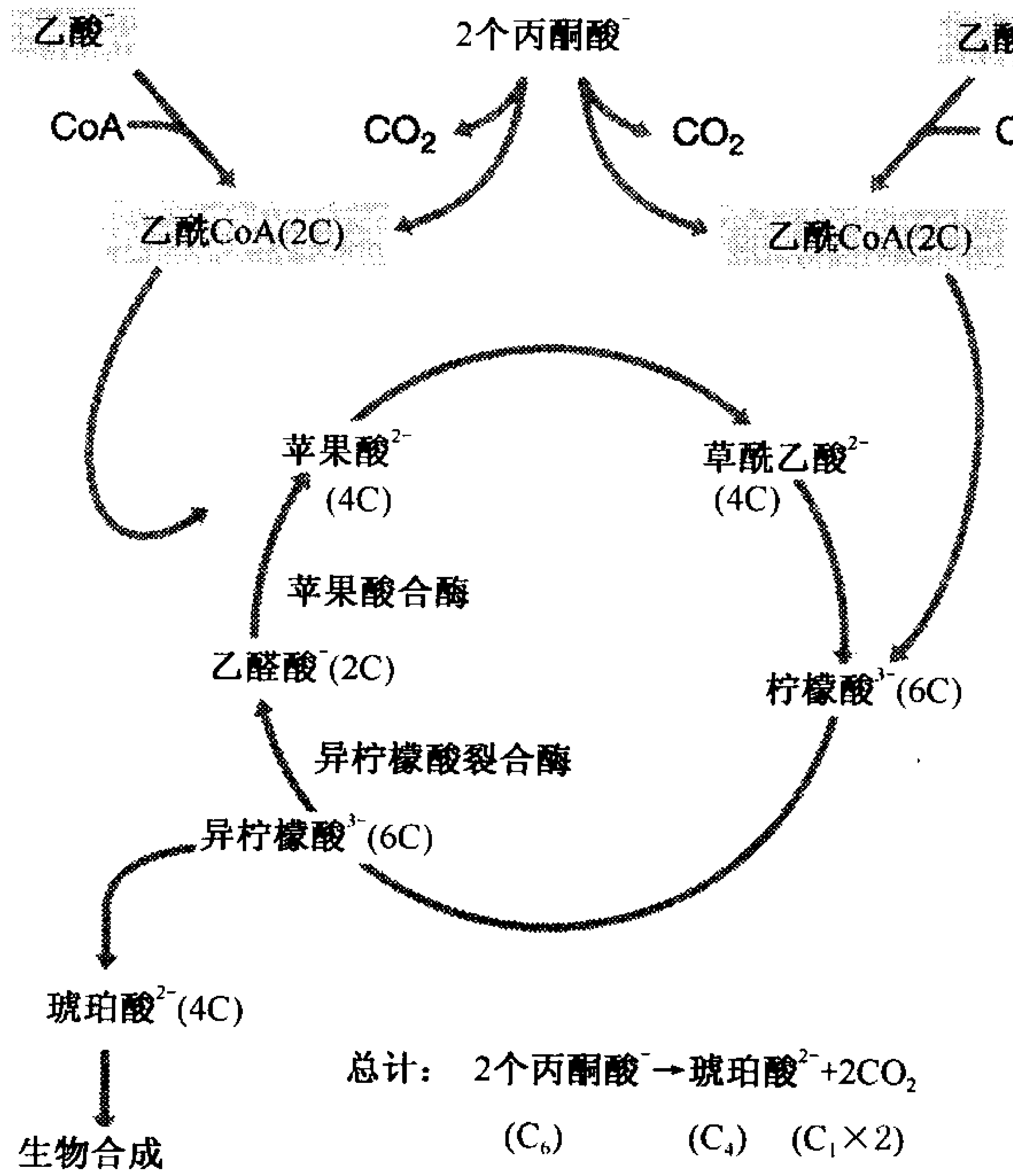


图 17.66　乙醛酸循环，从乙酸合成草酰乙酸。两种特征酶——异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶，与柠檬酸循环的大部分反应一起操纵乙醛酸循环。除了生长在丙酮酸上以外，生长在乙酸上时微生物也能够进行乙醛酸循环。

通过乙醛酸循环进行的生物合成如下：异柠檬酸裂解成琥珀酸和乙醛酸，由于乙醛酸结合乙酰辅酶 A 形成苹果酸，因此琥珀酸（或由其衍生的另外的柠檬酸循环中间体）可被用于生物合成。苹果酸能够被转变为草酰乙酸，从而维持柠檬酸循环在一种 C_4 中间体（琥珀酸）被消耗掉后能够正常运行。琥珀酸分子能够被直接用于合成卟啉（细胞色素、叶绿素和其他四吡咯类物质合成所需），还能够被氧化成草酰乙酸作为 C_4 氨基酸的碳骨架或转变为葡萄糖（通过草酰乙酸和磷酸烯醇丙酮酸）。

丙酮酸和 C_3 的利用

C_3 化合物，如丙酮酸或者能够转变为丙酮酸的化合物（乳酸或碳水化合物），也不能单独通过柠檬酸循环被用作能源。因为柠檬酸循环中一些中间体被用于生物合成，保持柠檬酸循环运转的草酰乙酸是由丙酮酸或磷酸烯醇丙酮酸通过加入 1 个来自 CO_2 的碳原子而生成的。在一些微生物中，这步反应由丙酮酸羧化酶（pyruvate carboxylase）催化：

$$丙酮酸 + ATP + CO_2 \rightarrow 草酰乙酸 + ADP + Pi$$

而在其他微生物中是由磷酸烯醇丙酮酸羧化酶（phosphoenolpyruvate carboxylase）催化的：

$$磷酸烯醇丙酮酸 + CO_2 \rightarrow 草酰乙酸 + Pi$$

当柠檬酸循环的中间体被移走用于生物合成时，这些反应能够弥补损失的草酰乙酸，从而使循环能够继续运行。

概念检查

有机酸经常通过柠檬酸循环或乙醛酸循环途径进行代谢，异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶是乙醛酸循环的关键酶。

◆ 为什么进行乙醛酸循环的微生物必须生长在乙酸而不是琥珀酸上？

17.27 脂类作为微生物的营养物

自然界中脂类含量丰富。所有细胞的细胞质膜都含有脂类，不仅个体大的生物而且许多微生物都产生脂类储存物质，这些物质都能够被生物降解，并且是微生物产能代谢的优良底物。当细胞死亡时，它们的脂类被分解，终产物为 CO_2。

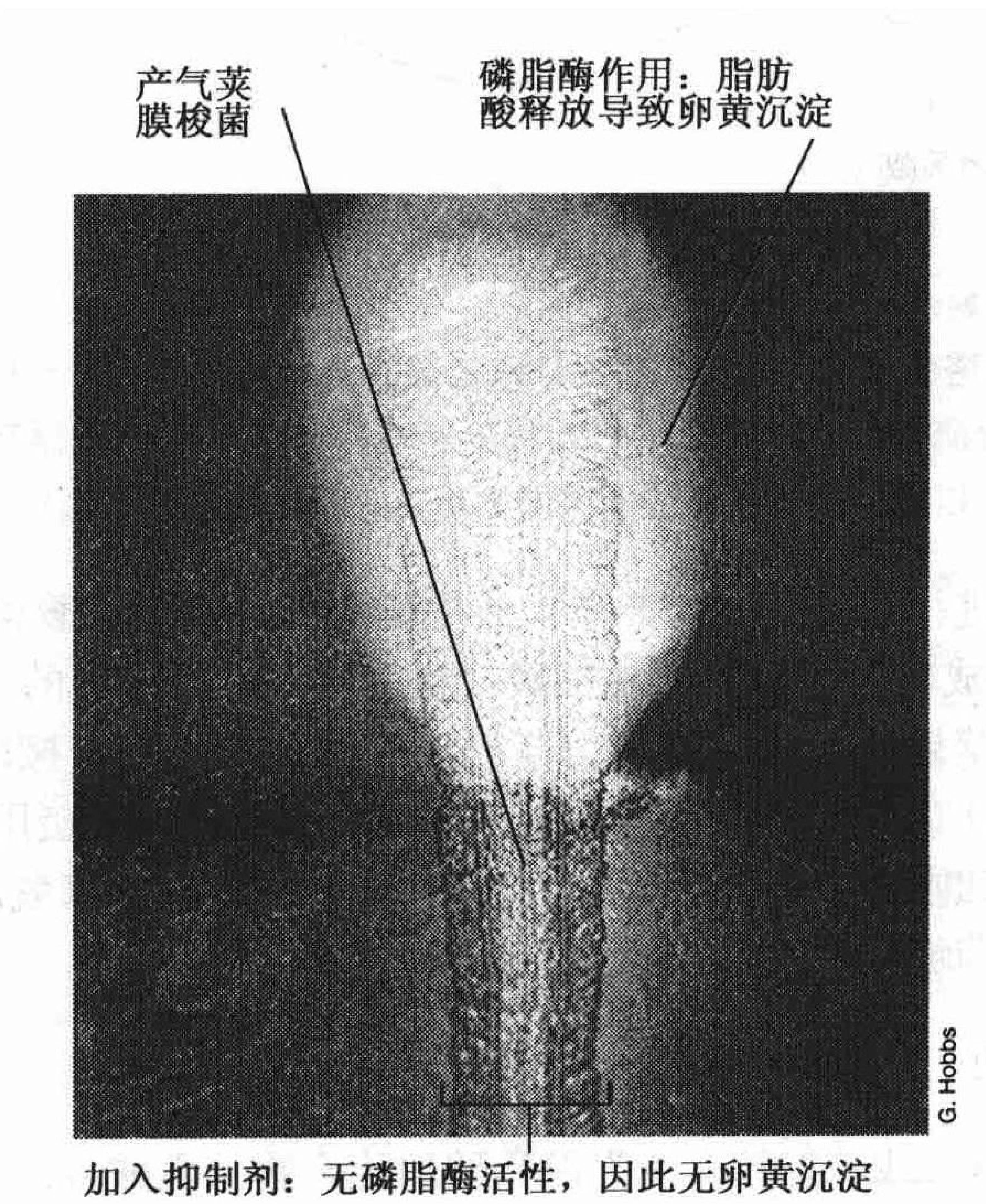


图 17.67　磷脂酶的作用。生长在含有卵黄的琼脂培养基上的条状产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）周围的磷脂酶作用情况。在平板的一半处加入了磷脂酶抑制剂，阻止了酶的作用。

脂肪和磷脂的水解

脂肪是甘油与脂肪酸形成的酯（见 3.4 节），易于从死亡的生物所释放的脂类中获得。当脂肪的酯键被水解之后才能够被微生物利用，催化酯键水解反应的胞外酶被称作脂酶（lipase）（图 17.67），形成的终产物为甘油和游离脂肪酸（图 17.67 和图 17.68），脂酶可以作用于含有不同链长脂肪酸的脂肪。磷脂由磷脂酶（phospholipase）水解，根据磷脂酶水解脂键的不同，用不同字母对其进行标识（图 17.68）。磷脂酶 A 和 B 裂解脂肪酸酯键，而磷脂酶 C 和 D 裂解磷酸酯键，所以它们是不同类型的酶。脂酶作用的结果是释放游离脂肪酸和甘油，所有这些物质都能够被多种化能有机营养微生物所利用。

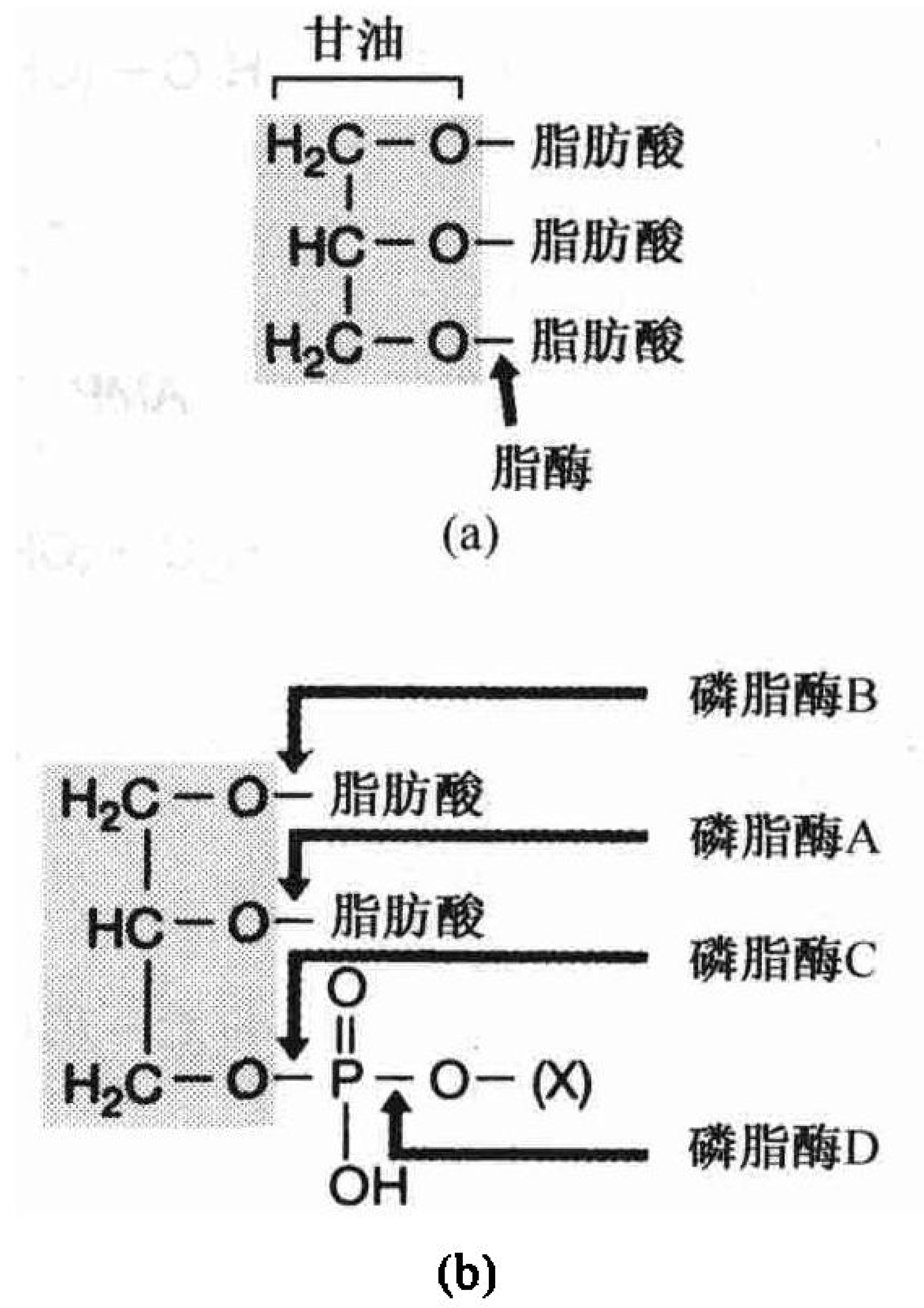


图 17.68　脂酶。（a）脂酶对脂肪的作用；（b）磷脂酶对磷脂的作用。显示出 4 种不同的磷脂酶 A、B、C 和 D 的作用位点。X 指的是不同磷脂的该位置处可能存在的一些小分子有机物。将此图与图 3.7 中更完整的磷脂图进行比较。

脂肪酸氧化

脂肪酸通过 β 氧化（β-oxidation）的过程被氧化，每进行一次 β 氧化降解脂肪酸的 2 个碳单位（图 17.69）。在真核生物中 β 氧化的酶类存在于线粒体中，而在原核生物中，β 氧化的酶类则存在于细胞质中。脂肪酸首先被辅酶 A 活化，氧化后释放出乙酰辅酶 A，形生缺少 2 个碳的脂肪酸（图 17.69）。然后继续重复 β 氧化过程，又释放出另一个乙酰辅酶 A 分子。

β 氧化过程中发生两次独立的脱氢反应。首先，电子转移给黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD），然后电子从 FAD 转移给 NAD^+。大部分脂肪酸都含有偶数的碳原子，它们彻底氧化后只产生乙酰辅酶 A。产生的乙酰辅酶 A 通过柠檬酸循环被氧化，或者通过乙醛酸循环转化为己糖和其他细胞组分。

脂肪酸是很好的电子供体。例如，C_{16}脂肪酸棕榈酸的氧化净合成 129 个 ATP，包括电子传递磷酸化产生的 ATP，其中电子是在 β 氧化形成乙酰辅酶 A 的过程中，以及乙酰辅酶 A 单位通过柠檬酸循环被氧化的过程中形成的（见 5.13 节）。

概念检查

脂肪通过被脂酶或磷脂酶水解为游离脂肪酸进行代谢，脂肪酸经过 β 氧化被氧化为乙酰辅酶 A 单位，继而再通过柠檬酸循环被氧化为 CO_2。

- ◆ 磷脂酶的功能是什么？
- ◆ β 氧化是什么意思？

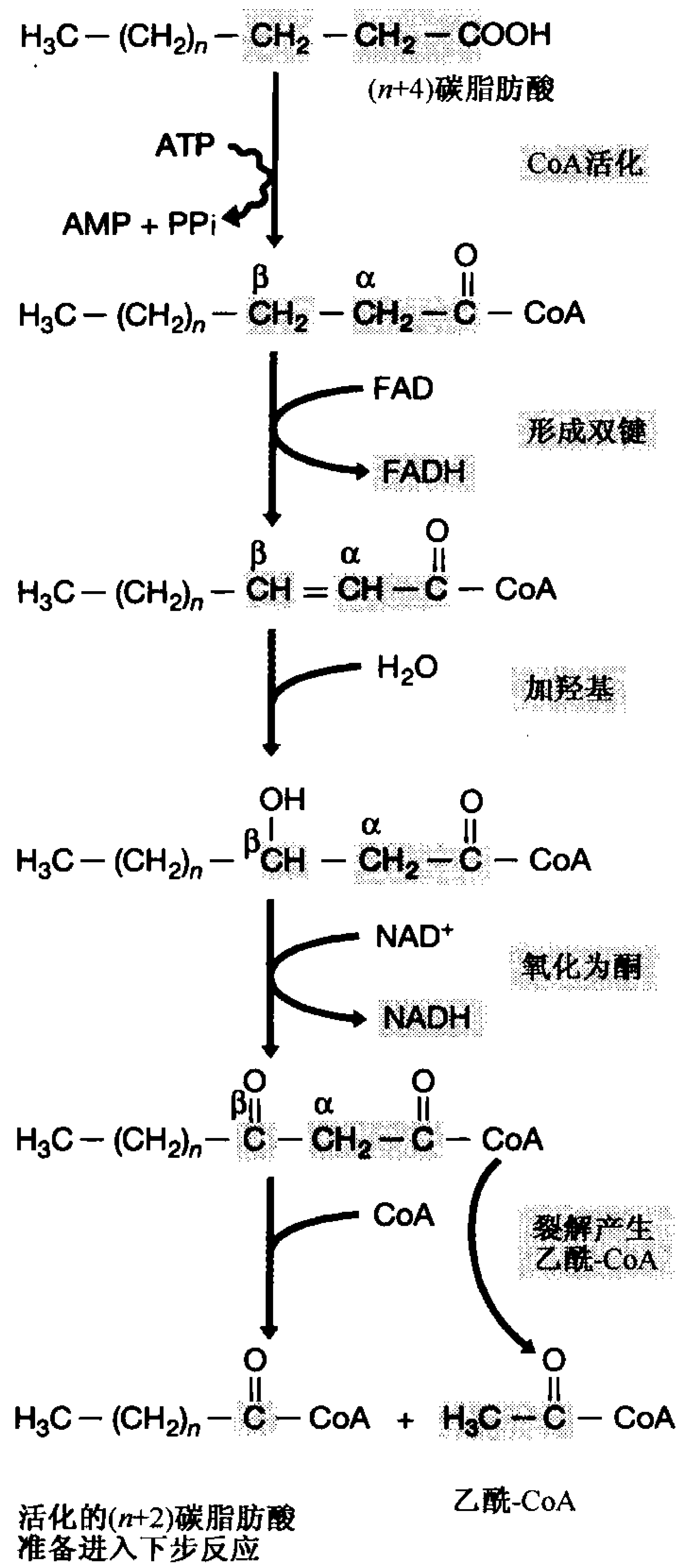


图 17.69 β氧化。脂肪酸β氧化的机制，即连续形成二碳片段——乙酰辅酶 A。

Ⅵ 固氮作用

利用 N_2 作为细胞氮源的过程称为固氮作用（nitrogen fixation），固氮能力使生物避免了对固定形式的氮的依赖。因为在微生物生态系统中对固定形式的氮有很高的需求，所以具有固氮能力的细胞具有明显的生态优势。此外，某种形式的固氮作用对农业也很重要，因为它促进了一些重要中耕作物（如大豆）的耕种。

17.28 固氮酶和固氮作用过程

只有某些原核生物能够固定 N_2，其中一些是好氧的，一些是厌氧的，表 17.10 简略列出了一部分固氮微生物。一些固氮细菌是独立生长的，在进行固氮时不需要寄主。相反，其他固氮细菌是共生的（symbiotic），仅和特定的植物一起进行固氮（见 19.22 节），但是固定 N_2 的是细菌而不是植物。就目前所知，还没有发现任何真核生物固氮的现象。

表 17.10 一些固氮微生物[a]

自生好氧微生物		
化能有机营养菌	光养菌	化能无机营养菌
细菌：	蓝细菌	产碱杆菌(*Alcaligenes*)
固氮菌(*Azotobacter*)		硫杆菌(*Thiobacillus*)
氮单胞菌(*Azomonas*)		嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus*)
农杆菌(*Agrobacterium*)		热自养链霉菌(*Streptomyces thermoautotrophicus*)
克雷伯氏菌(*Klebsiella*)[b]		
拜叶林克氏菌(*Beijerinckia*)		
多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)		
黄色分枝杆菌(*Mycobacterium flavum*)		
生脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)		
弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)		
重氮营养醋杆菌(*Acetobacter diazotrophicus*)		
甲基单胞菌(*Methylomonas*)		
甲基球菌(*Methylococcus*)		
甲基弯菌(*Methylosinus*)		
假单胞菌(*Pseudomonas*)		
自生厌氧微生物		
化能有机营养菌	光养菌	化能无机营养菌
细菌：	细菌：	古生菌：
梭菌(*Clostridium*)	着色菌(*Chromatium*)	甲烷八叠球菌(*Methanosarcina*)
脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)	外硫红螺菌(*Ectothiorhodospira*)	甲烷球菌(*Methanococcus*)
脱硫菌(*Desulfobacter*)	荚硫菌(*Thiocapsa*)	甲烷杆菌(*Methanobacterium*)
脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum*)	绿菌(*Chlorobium*)	甲烷螺菌(*Methanospirillum*)
	绿棒菌(*Chlorobaculum*)	甲烷叶菌(*Methanolobus*)
	红螺菌(*Rhodospirillum*)	
	红假单胞菌(*Rhodopseudomonas*)	
	红微菌(*Rhodomicrobium*)	
	红球形菌(*Rhodopila*)	
	红细菌(*Rhodobacter*)	
	阳光杆菌(*Heliobacterium*)	
	阳光小杆菌(*Heliobacillus*)	
	嗜阳菌(*Heliophilum*)	

共生型	
豆科植物	非豆科植物
大豆、豌豆、三叶草、洋槐等，与之共生的细菌有根瘤菌(*Rhizobium*)属的慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)、中华根瘤菌(*Sinorhizobium*)或固氮根瘤菌(*Azorhizobium*)	桤木(*Alnus*)、杨梅(*Myrica*)、美洲茶(*Ceanothus*)、香蕨木(*Comptonia*)、木麻黄(*Casuarina*)，与之共生的为放线菌的弗兰克氏菌(*Frankia*)属

a. 所列的有些属中，只有一种或几种菌能够进行固氮作用。

b. 只在无氧条件下进行固氮。

固氮酶

在固氮过程中，N_2被还原成氨，然后氨转变成有机形式。还原过程由固氮酶（nitrogenase）复合物催化完成，固氮酶复合物由固氮酶和固氮酶还原酶两个独立的蛋白质构成，两种蛋白质都含有铁，并且固氮酶还含有钼。固氮酶中的铁和钼包含于一个称作 FeMo-co 的辅助因子中（图 17.70），实际上 N_2的还原反应在 FeMo-co 中心进行。FeMo-co 的成分是 $MoFe_7S_8$ · 高柠檬酸（图 17.70），而且每分子固氮酶存在 2 个 FeMo-co 拷贝。

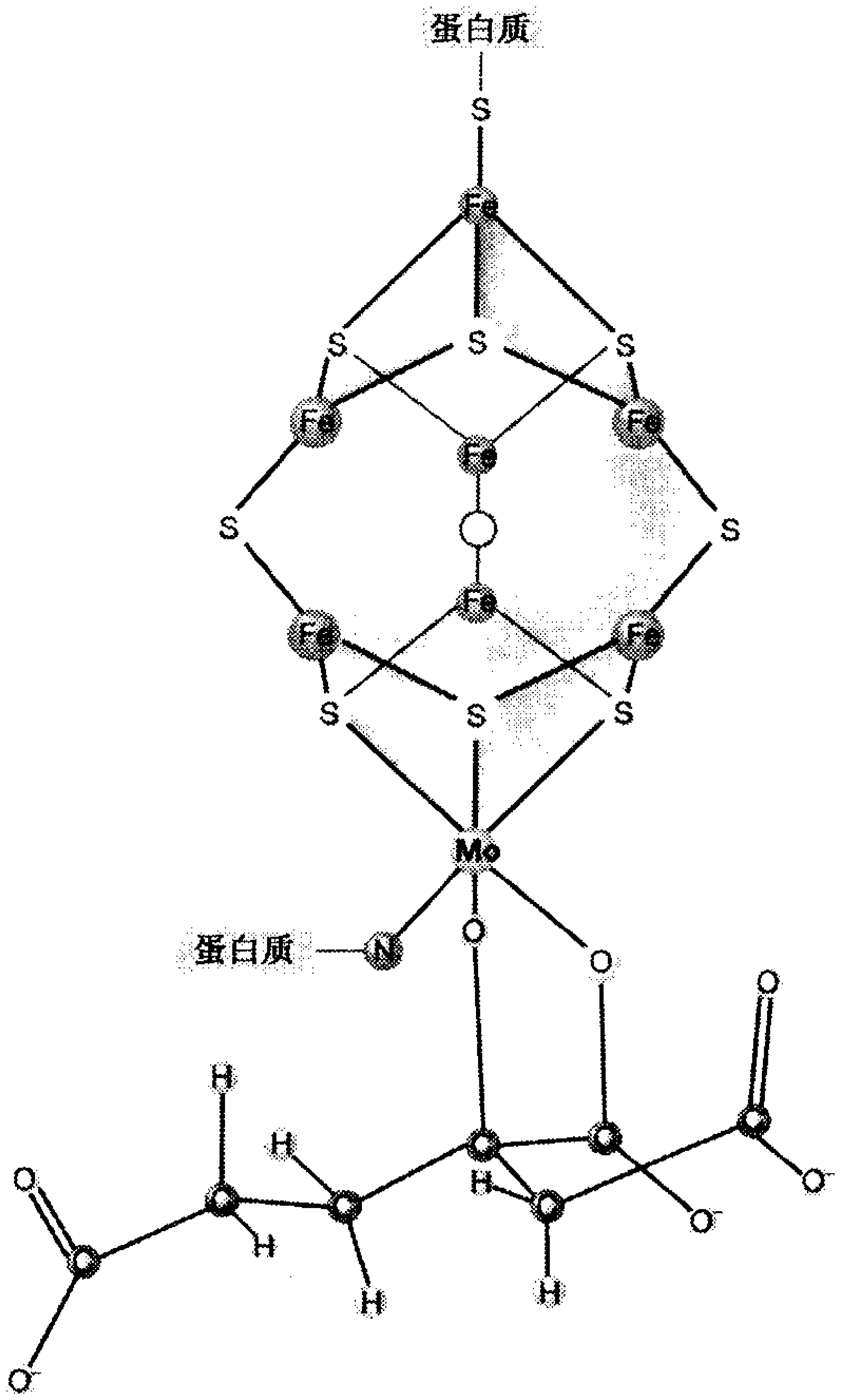


图 17.70　固氮酶中铁钼辅助因子 FeMo-co 的结构。图的顶部是与钼结合的 Fe_7S_8 立方体，钼与高柠檬酸上的氧原子（底部，所有氧原子以绿色显示）以及固氮酶上的 N 和 S 原子相结合，每个固氮酶分子含有 2 分子的 FeMo-co。固氮酶复合体的组分——固氮酶和固氮酶还原酶之间的相互作用显示于图 17.71 中。

由于氮分子中三键的稳定性，致使 N_2非常具有惰性，所以氮的活化是一个相当耗能的过程。必须有 6 个电子转移给 N_2才能使之还原成 NH_3，3 个连续的还原反应直接发生在固氮酶上，并且无游离中间体的积累（图 17.71）。

固氮作用被氧抑制，因为氧可以使固氮酶还原酶迅速不可逆失活，即使这种酶是从好氧菌中分离出来的也是如此。在好氧固氮细菌中，有氧存在的情况下固氮作用能够在

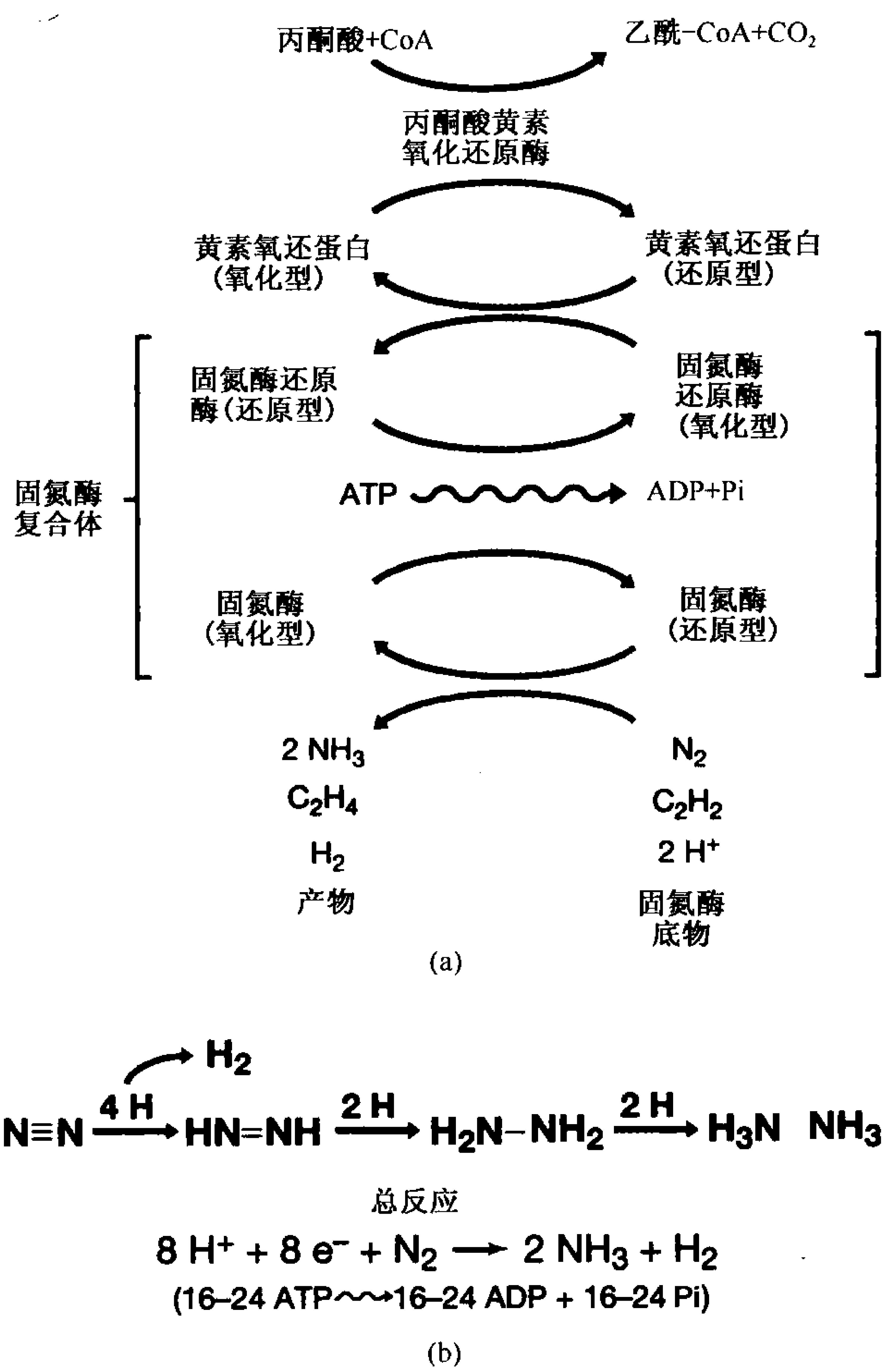


图 17.71 固氮酶的功能。（a）显示了从丙酮酸开始的固氮步骤。电子在同一时间由固氮酶复合体的还原酶供给固氮酶，每提供 1 个电子的同时水解 2 或 3 个 ATP。（b）N_2还原的假设步骤，显示了 H_2的释放步骤以及固氮酶的总活力。

整个细胞中进行，但是却不能在纯的酶制备物中进行。这是因为这些生物可以通过几种不同机制中的一种避免固氮酶的氧失活，其中包括通过呼吸作用迅速除去氧，形成阻碍O_2的黏液层（图 17.72），或者像某些蓝细菌那样将固氮酶分割在特殊类型的细胞中（异形胞）（见 12.25 节）。此外，虽然固氮作用在暴露于氧的细胞提取物中无法发生，但是在好氧固氮微生物如固氮菌（*Azotobacter*）中，固氮酶通过与一种特殊蛋白质形成复合物避免了 O_2引起的失活，这个过程称为构象保护。

固氮作用中的电子流

固氮酶中电子传递的顺序如下：电子供体→固氮酶还原酶→固氮酶→N_2（图 17.71）。用于氮还原的电子从铁氧还蛋白或黄素氧还蛋白（二者均为低电位的铁硫蛋白，见 5.11 节）传递到固氮酶还原酶。在巴氏梭菌（*Clostridium pasteurianum*）中，铁氧还蛋白为电子供体，通过将丙酮酸裂解成乙酰辅酶 A 和 CO_2而被还原。除了还原

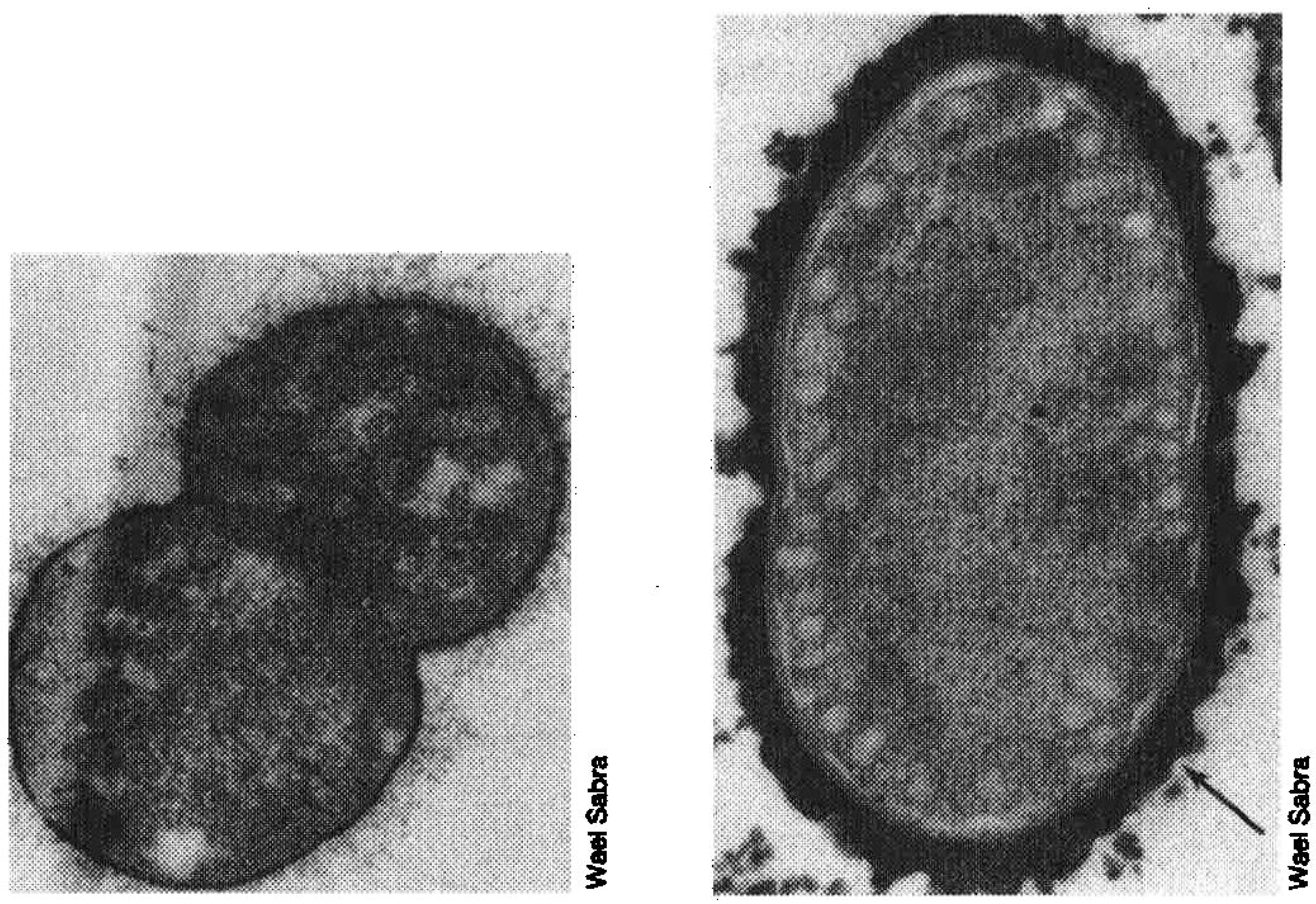


图 17.72 棕色固氮菌（*Azotobacter vinelandii*）固氮细胞中因氧形成的黏液层。（a）在含有 2.5% O_2的微氧环境中生长的细胞的透射电镜图，只可见非常薄的黏液层。（b）细胞在空气（氧含量 21%）中生长，注意被染成极黑色的黏液层（箭头所指），黏液层阻止氧扩散进入细胞中，从而避免了固氮酶的氧失活。

型铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白之外，N_2的固定还需要 ATP。在电子传递的每一次循环中，固氮酶还原酶被铁氧还蛋白/黄素氧还蛋白还原并结合 2 分子的 ATP。ATP 的结合改变了固氮酶还原酶的构象并降低了它的还原电位，使其能够和固氮酶相作用。当电子传递到固氮酶上时，ATP 被水解，固氮酶还原酶与固氮酶解离，开始进行另一轮的还原及与氧结合的循环（图 17.71）。在适当的还原状态下，固氮酶将 N_2还原为 NH_3，还原反应实际上发生在 FeMo-co 中心（图 17.70）。

尽管将 N_2还原为 NH_3只需要 6 个电子，但是整个还原过程实际上消耗了 8 个电子，因为每摩尔 N_2被还原时，有 2 个电子以 H_2的形式被损失（图 17.71）。这种明显的浪费现象的原因尚不清楚，但是显然 H_2的释放是固氮酶反应机制的一个不可分割的部分。

替代型固氮酶

一些固氮细菌在某些生长条件下能产生无钼的固氮酶，这些被称为替代型的固氮酶只在钼的位置含有钒和铁或只含有铁。类似于 FeMo-co 的辅助因子存在于这些替代型固氮酶中，FeVa-co 辅助因子存在于钒固氮酶中，在铁固氮酶中有类似于 FeMo-co 和 FeVa-co 辅因子的铁硫簇，但是缺少钼和钒。当钼充足时，替代型固氮酶不能合成，因为含钼固氮酶是细胞中主要的固氮酶。替代型固氮酶的功能主要是作为一种后备酶，以确保环境中缺少钼时固氮作用仍能够发生（见 12.9 节）。固氮古生菌缺少依赖于钼和钒的固氮系统，只有含铁的固氮酶。

热自养链霉菌的独特固氮酶

一种结构和功能都比较新颖的含钼固氮酶发现于嗜热的链霉菌——热自养链霉菌

(*Streptomyces thermoautotrophicus*) 中。该菌为嗜热菌（最适生长温度为 65℃），属丝状放线菌（见 12.24 节）。热自养链霉菌是一种氢细菌，能够利用一氧化碳（CO）作为电子供体。热自养链霉菌能够固氮，它的固氮酶中含有钼，但是与经典的钼固氮酶不同，热自养链霉菌的固氮酶对 O_2 完全不敏感。热自养链霉菌固氮酶复合物中的固氮酶称为 Str1，它含有 3 种不同的多肽，在结构上和来自其他固氮菌的固氮酶多肽存在相似性。相反，被称为 Str2 的固氮酶还原酶组分则和其他固氮酶还原酶没有任何相似性。然而，Str2 和含锰的超氧化物歧化酶（superoxide dismutase）具有高度同源性（见 6.16 节），这也是它在这种不寻常的固氮酶中所起的作用（图 17.73）。

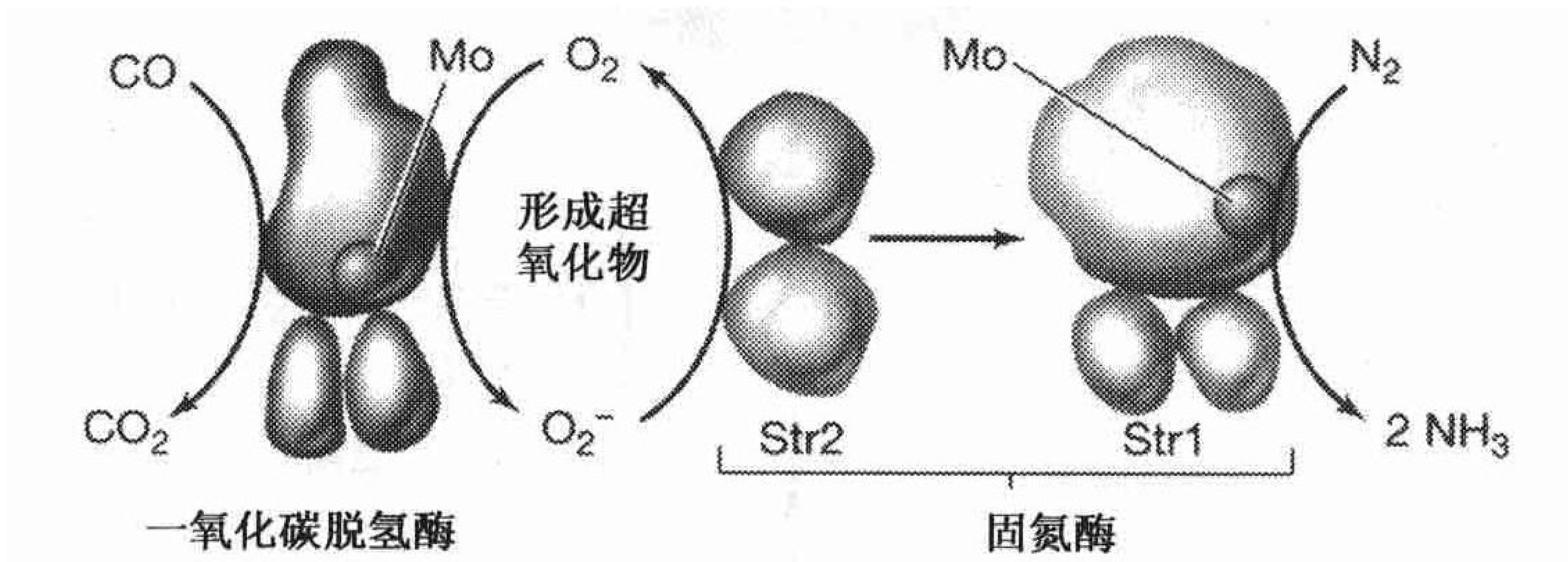


图 17.73 热自养链霉菌的固氮反应。尽管 Str2 和 Str1 与固氮酶还原酶和固氮酶是完全不同的蛋白质，但是 Str2 和 Str1 在功能上分别等同于固氮酶还原酶和固氮酶。

热自养链霉菌中有一种模仿经典固氮酶的电子传递方式。在热自养链霉菌中，Str2 将电子传递给 Str1，电子来源于超氧负离子（O_2^-），而 O_2^- 是在一氧化碳脱氢酶的作用下还原 O_2 产生的（图 17.73）。因此，与经典固氮酶的反应顺序：丙酮酸→黄素氧还蛋白→固氮酶还原酶→固氮酶相似，热自养链霉菌的反应顺序为 CO→O_2^-→Str2→Str1。值得注意的是，热自养链霉菌中固氮酶不但不像所发现的所有经典固氮酶那样被氧抑制，相反，在该酶的反应机制中氧还是必需的。

热自养链霉菌的固氮酶还具有其他一些独特性质，包括对 ATP 的消耗少于经典固氮酶所消耗的一半，不还原其他的三键化合物如乙炔（图 17.74）等。总之，热自养链霉菌固氮酶的这些特性，尤其是对氧的不敏感性，给植物生化学家带来了希望，他们试图通过基因工程的方法使不具备已知固氮共生体的农作物如玉米能够固氮。

固氮酶活性测定：乙炔还原

固氮酶对 N_2 不是特异性的，因为固氮酶还可以还原其他一些含三键的氰化物（CN^-）和乙炔（HC≡CH）等化合物。固氮酶还原乙炔只转移 2 个电子，同时产生乙烯（$H_2C=CH_2$）。乙炔还原为乙烯为我们提供了一个简便、快速的利用气相色谱测定固氮酶体系活力的方法（图 17.74），乙炔还原技术（acetylene reduction technique）已经广泛用于检测未知体系的固氮作用。

固氮作用的确切证据是利用氮同位素 ^{15}N 作为示踪元素获得的（^{15}N 不是放射性同位素，而是稳定的同位素，用质谱可以测出）。使培养物的气相部分富含 $^{15}N_2$，培养之后，细胞和培养基被消化，产生的氨通过蒸馏分离，并测定氨中 ^{15}N 的含量。如果显著产生 ^{15}N 标记的 NH_3，就证明发生了固氮作用。

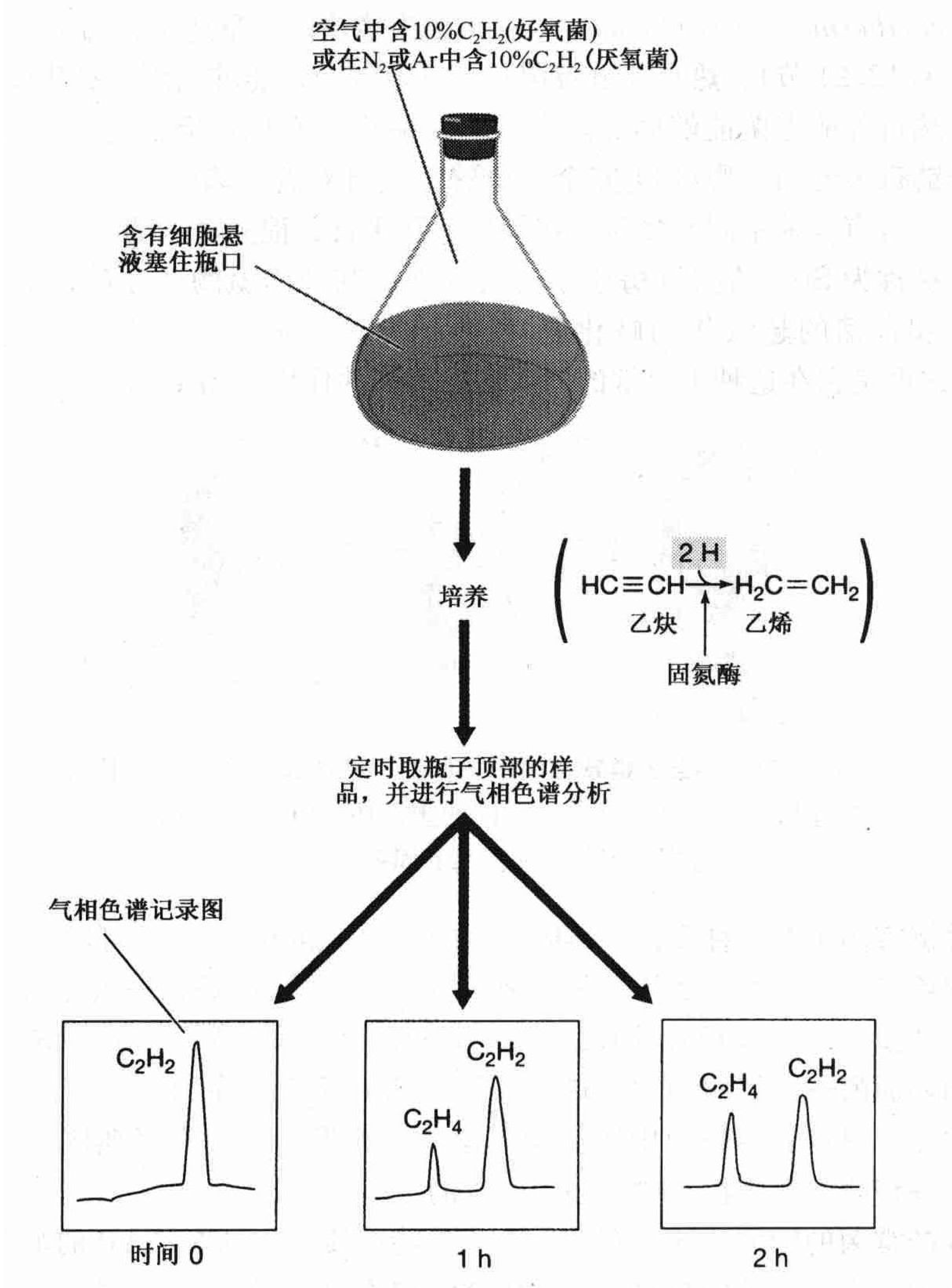


图 17.74　乙炔还原法测定固氮酶活性。结果表明，实验开始时（0 时）无 C_2H_4，但是随着实验的继续，C_2H_4 产量增加。注意，随着 C_2H_4 的产生，C_2H_2 是如何被消耗的？如果瓶中含有酶提取物，条件应该是厌氧，即使固氮酶来源于好氧细菌，也是如此。

尽管^{15}N 同化法被认为是测定固氮作用的“金标准”，但是乙炔还原法却是一种更快捷、更灵敏的测定固氮作用的方法，虽然它的测定过程不是直接的。样品可以是土壤、水、培养物或细胞提取物，将其与乙炔进行保温培养，然后用气相色谱测定反应混合物气相中的乙烯产量（图 17.73）。这种方法比其他方法更加简单、快速，而且适于野外使用，可以直接在固氮细菌的生境中对其进行生态学研究。

17.29 固氮作用的遗传学和调节

因为 N_2 的固定是一个高度需能过程，所以固氮酶的合成和活性是受到高度调节的，这些调节因子以及涉及固氮的酶需要很多基因去编码它们，在这里我们来对其进行讨论。

固氮作用的遗传学

肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）是一种研究得较为透彻的固氮生物，其固氮酶和固氮酶还原酶的基因是一个被称为 *nif* 调控子（regulon）的复合调控子（大的操纵子网络，见 8.6 节）的一部分。肺炎克雷伯氏菌 *nif* 调控子全长为 24kb，含有 20 个排列成几个转录单位的基因（图 17.75）。除了固氮酶结构基因外，FeMo-co 基因、控制电子转运蛋白的基因以及一系列调节基因也存在于 *nif* 调控子中。

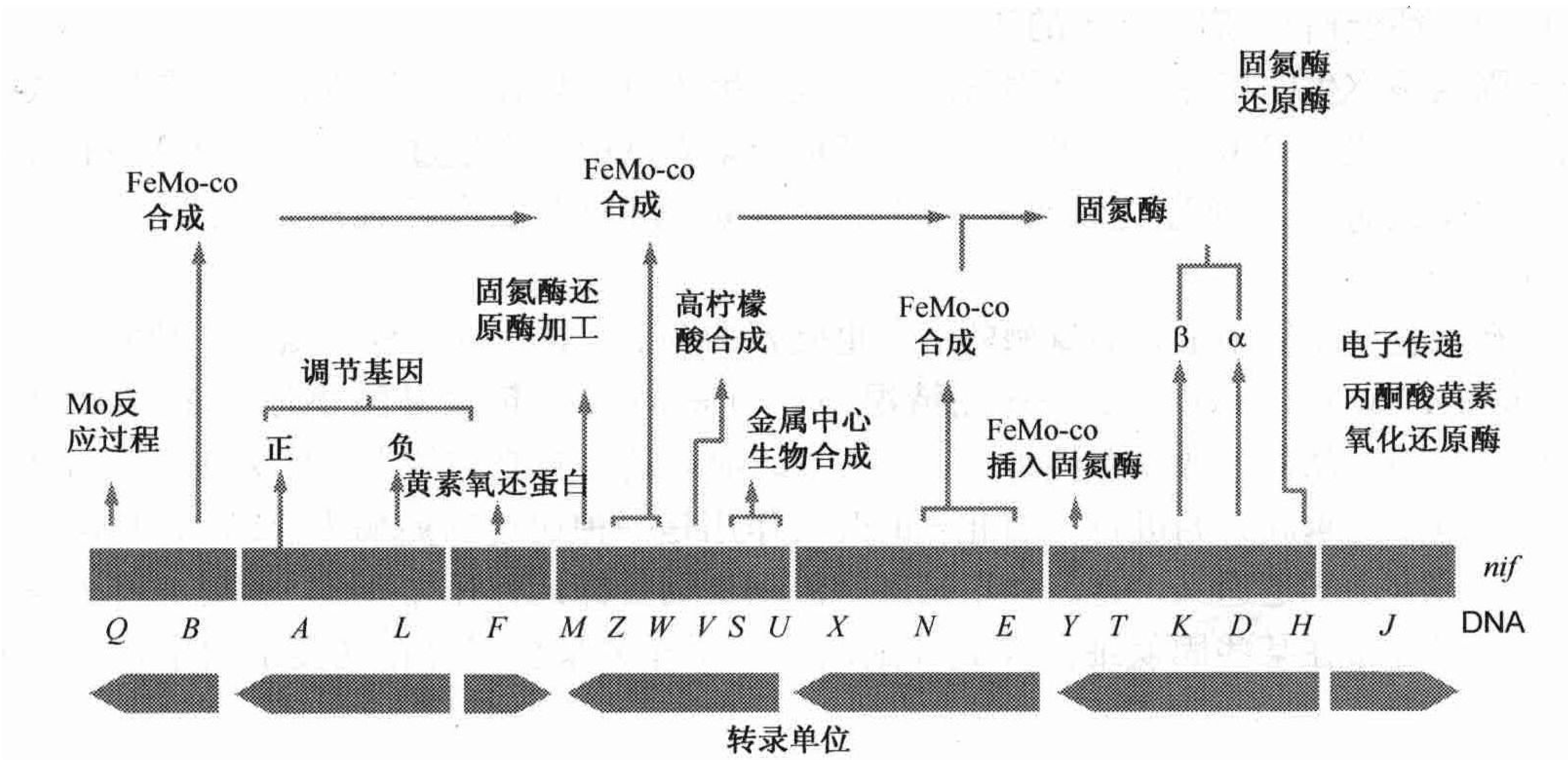


图 17.75　研究较透彻的固氮生物肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）的 *nif* 调控子。 一些基因的功能还未确定。mRNA 转录子（转录单位）在基因下显示，箭头表示转录方向。合成 FeMo-co 的蛋白质以黄色显示，其他颜色与图 17.71 相吻合。尽管克雷伯氏菌能够将氨作为氮源进行有氧生长，但是固氮作用仅发生在无氧条件下。

固氮酶是由两个亚基组成的复合蛋白，两个亚基分别为 α 亚基（*nifD* 的产物）和 β 亚基（*nifK* 的产物），在固氮酶复合物中每一个亚基都有两个拷贝。固氮酶还原酶是由两个相同亚基组成的蛋白质二聚体，是 *nifH* 的产物。FeMo-co 是由几个基因共同参与合成的，这些基因包括 *nifN*、*V*、*Z*、*W*、*E* 和 *B*，以及 *Q*，*Q* 基因用于编码一种涉及钼加工的产物。*nifA* 基因编码一种正调节蛋白，此调节蛋白激活其他 *nif* 基因的转录（图 17.75）。

固氮酶是一个高度保守的蛋白质，编码保守区的 *nifHDK* 基因被用作核酸探针对不同原核生物的 DNA 进行筛选以寻找同源基因，以此获取是否具有固氮能力的信息。在所有检测的固氮菌中（极不寻常的热自养链霉菌除外，见 19.28 节），都发现有类似

nifHDK 基因的存在，这说明固氮酶对这段基因的需求具有特异性。替代型固氮酶（见 19.28 节）由它们自己的基因编码，*vnfHDK* 存在于钒固氮酶体系中，*anfHDK* 存在于只有铁的固氮酶体系中，这两个基因都显示出和 *nifHDK* 具有明显的序列同源性。

固氮作用的调节

固氮酶受到严格的调节控制。固氮作用可被 O_2、已固定的氮（包括 NH_3、NO_3^-）以及某些氨基酸所抑制，调节的主要部分发生在转录水平上（图 17.75）。NifA 蛋白可激活 *nif* 结构基因的转录（正调节），而 NifL 是 *nif* 基因表达的负调控因子，含有一分子的 FAD（FAD 是黄素蛋白的氧化还原辅酶，见 5.11 节），与氧的探测有关。当存在足够的氧时，NifL 的功能是关闭 *nif* 基因的转录以阻止氧不稳定性固氮酶的合成。

氨通过另一种叫做 NtrC 的蛋白质来抑制固氮作用，该蛋白质的活性受细胞内氮状态的调节。当氨缺乏时，NtrC 显示活性，促进 *nifA* 的转录，以产生 NifA 蛋白（固氮作用的激活蛋白），启动 *nif* 的转录。

固氮酶产生的氨并不抑制固氮酶的合成，因为氨一旦合成便迅速转化为有机形式并用于生物合成。但是当氨过量（如自然环境或培养基中氨含量过高）时，固氮酶的合成便很快受到抑制。通过这种方式，就不会浪费 ATP 去生产环境中已经大量存在的产物。

在某些固氮细菌中，固氮酶的活性也受氨的调节，这一现象称为氨的“开关”效应（ammonia switch-off effect）。在此情况下，过量的氨引起固氮酶还原酶的共价修饰（见 8.3 节），从而导致酶活性丧失。当氨缺乏时，这些被修饰的蛋白质又转变为活性状态，固氮反应重新开始进行。因此氨的开关作用是一种通过固氮酶来控制 ATP 消耗的方法，该方法既迅速又可逆。并不是所有的固氮细菌都具有开关系统，但是此开关系统依旧广泛分布在某些固氮细菌如光养细菌中，而开关系统就是在这类细菌中被首次发现的。

概念检查

固氮作用将 N_2 还原为 NH_3 涉及被称为固氮酶的酶复合物，固氮酶复合物由固氮酶和固氮酶还原酶组成，大部分固氮酶都含有钼或钒和铁作为金属辅助因子，而且固氮过程是一个高度需能过程。固氮酶和多数相关的调节蛋白由 *nif* 调节子编码。某些和 N_2 在结构上相似的物质，如乙炔和氰化物也可以被固氮酶还原。固氮酶和固氮作用都是被高度调节的过程，O_2 和 NH_3 是两个主要的调节因子。

◆ 写出一个由固氮酶催化并配平的反应方程式。

◆ FeMo-co 是什么？含有什么金属？

◆ 乙炔如何用于固氮研究？

◆ 影响固氮酶功能的物理化学因子是什么？热自养链霉菌的固氮酶系统和我们所讨论过的固氮酶的特征有什么不同？

复习题

1. 有氧光养生物和厌氧光养生物的主要不同点是什么？（见 17.1～17.5 节）
2. 集光叶绿素和反应中心叶绿素的功能是什么？为什么失去产生集光叶绿素能力的突变体（这种突变体易于从实验室分离）在自然界中可能不会成为优胜者？（见 17.2 节）
3. 紫色细菌中光合色素位于哪个位置？蓝细菌呢？绿藻呢？从叶绿素的功能来看，为什么它们不能位于细胞内的其他位置，如细胞质或细胞壁内？（见 17.3 节）
4. 存在于光养生物中的辅助色素是什么？它们有什么功能？（见 17.3 节）
5. 在厌氧光养生物中，光是如何导致 ATP 产生的？光合作用电子流与呼吸作用电子流在哪些方面相似？哪些方面不同？（见 17.4 节）
6. 紫色细菌是如何产生还原力进行自养生长的？而蓝细菌呢？（见 17.4 节）
7. 叶绿素 a 在光合系统Ⅰ和光合系统Ⅱ中的还原电位有何不同？为什么光合系统Ⅱ叶绿素的还原电位必须有很高的正电性？（见 17.5 节）
8. 进行卡尔文循环的微生物中两个特征酶是什么？它们催化的反应是什么？如果菌体发生突变缺少任何一种酶，其结果会怎样？（见 17.6 节）
9. 什么微生物能利用羟丙酸循环或反向柠檬酸循环作为自养途径？（见 17.7 节）
10. 对照和比较紫色光养细菌和无色硫细菌如贝日阿托氏菌对硫化氢的利用。在每一种生物中 H_2S 在代谢中起什么作用？（见 17.8 节）
11. 罗尔斯通氏菌和硫杆菌利用的是哪种无机电子供体？（见 17.9 节和 17.10 节）
12. 影响氧化亚铁嗜酸硫杆菌代谢能量的特殊环境是什么？（见 17.11 节）
13. 将典型的硝化作用与厌氧氨氧化在氧需求、涉及的微生物以及单加氧酶的需求方面进行比较。（见 17.12 节）
14. 在大肠杆菌中硝酸盐还原酶的合成受到 O_2 的阻遏，基于生物能学的观点，你认为这种阻遏现象为什么能发生？（见 17.13 节和 17.14 节）
15. 脱硫弧菌中为什么氢化酶是组成型酶？（见 17.15 节）
16. 从以下几方面对比乙酸生成作用和产甲烷作用：①能量代谢的底物和产物；②能量代谢中利用有机化合物作为电子供体的能力；③自养的机制；④通过有氧呼吸进行生长的能力。（见 17.16 节和 17.17 节，回答这些问题前你可以先复习一下 13.4 节的材料）
17. 从以下几方面对比 Fe^{3+} 还原和还原脱氯作用：①还原产物；②环境的重要性。（见 17.18 节）
18. 解释底物水平磷酸化，它与氧化磷酸化有何不同？假如一种微生物是兼性的，什么样的基本营养条件决定其从底物水平磷酸化而不是从氧化磷酸化获得能量？（见 17.19 节）
19. 虽然许多种化合物从理论上讲都是可发酵的，但是为了使发酵过程能够进行，大多数有机化合物最终必须转变为某种小分子，这些小分子是什么？为什么必须产生它们？（见 17.19 节和 17.20 节）

20. 缺少底物水平磷酸化时，发酵如何进行？（见 17.20 节）
21. 为什么互养共栖有时被称为“种间 H_2转移”？（见 17.21 节）
22. 单加氧酶和双加氧酶所催化的反应有什么不同？（见 17.22 节和 17.23 节）
23. 甲基营养菌和产甲烷生物有何不同？Ⅰ型和Ⅱ型甲基营养菌在碳的同化方式上有何不同？（见 17.24 节）
24. 对比纤维素和胞内淀粉转变为葡萄糖单体的过程，此过程涉及哪些酶？哪一个反应过程能效更高？（见 17.25 节）
25. 乙醛酸循环的主要功能是什么？（见 17.26 节）
26. 为什么十六烷（C_{16}）的有氧分解代谢需要加氧酶，而十六碳脂肪酸棕榈酸却不需要？（见 17.22 节和 17.27 节）
27. 写出由固氮酶催化的反应。在这一反应中需要多少个电子？有多少个电子实际上被利用？请解释。（见 17.28 节）
28. 热自养链霉菌的固氮酶与固氮菌的固氮酶有何不同？（见 17.28 节）
29. *nif* 调节因子中实际编码固氮酶蛋白的基因是哪些？（见 17.29 节）

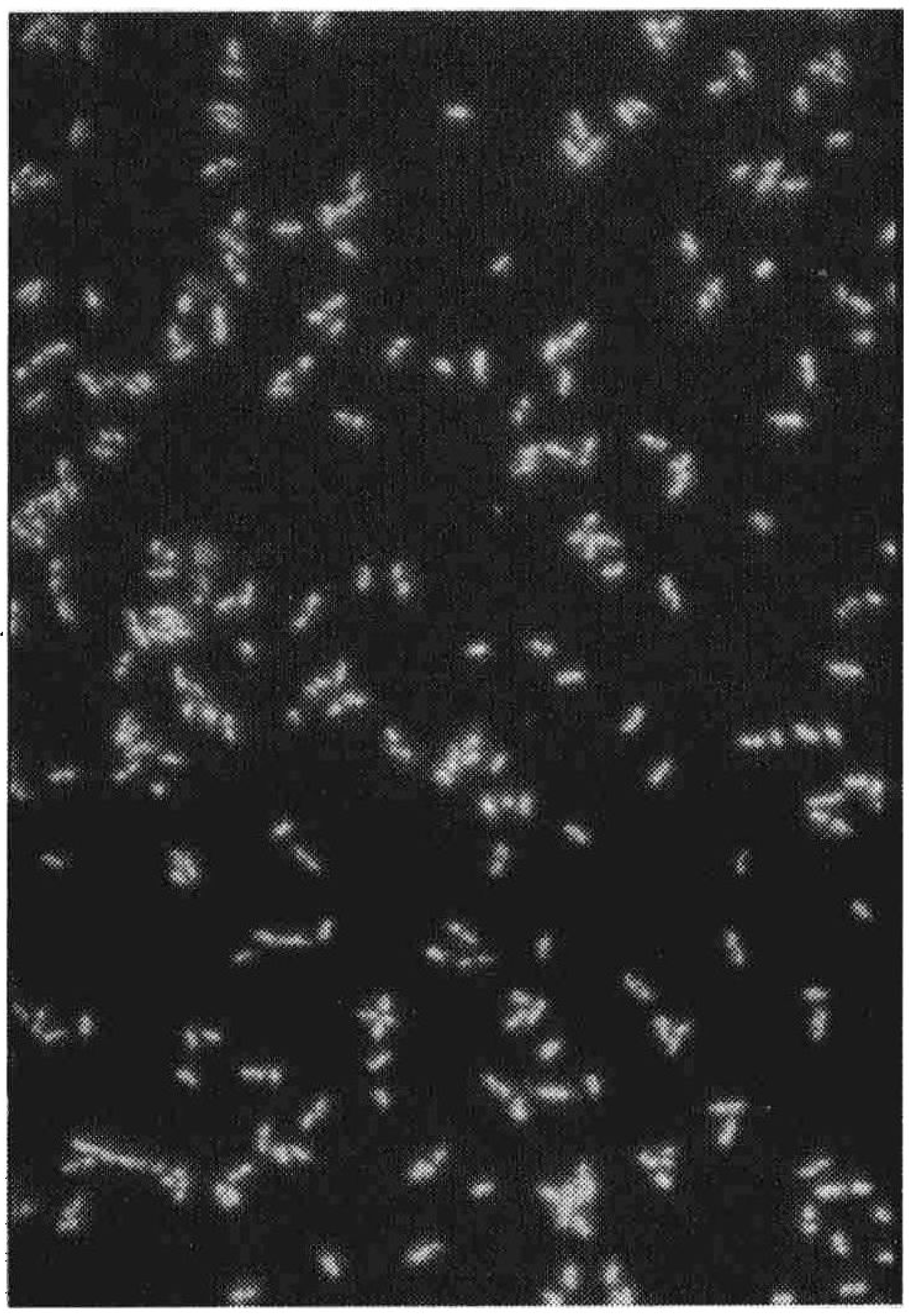
应用题

1. 对比叶绿素 a 和细菌叶绿素 a 的吸收光谱。每一种色素优先吸收的波长是多少？这些分子的吸收特性怎样与肉眼可见的光谱区进行比较？为什么大部分植物是绿色的？
2. 光养紫色细菌红细菌的生长速率在以苹果酸作为碳源的培养基上光养生长时是以 CO_2为碳源（以 H_2作为电子供体）生长时的 2 倍。讨论为什么会出现这种结果，列出红细菌在两种不同的条件下生长时，相应的营养类型。
3. 虽然在生理上有区别，但是化能无机营养生物与化能有机营养生物在 ATP 的合成上有许多共同特征。讨论这些共同点，以及化能有机营养生物利用葡萄糖呼吸时的生长量（每摩尔底物产生细胞的克数）远高于化能无机营养菌以硫呼吸时的生长量的原因？
4. 当从 CO_2（加上 H_2）或甲醇（无 H_2）产生甲烷时，利用了图 17.44 和图 17.45 所示途径中的许多步骤。对比这两种底物的产甲烷作用，讨论它们必须按相反方向进行代谢的原因。
5. 虽然葡聚糖是葡萄糖的多聚物，但是却不能用葡萄糖制造葡聚糖，解释其原因。葡聚糖的合成在口腔卫生上的重要性（见 21.3 节）？
6. 荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）能够在有氧条件下生长在苯甲酸上，而光养细菌沼泽红假单胞菌能够在厌氧条件下生长在苯甲酸上。对比这两种菌株对苯甲酸的代谢过程，着重考虑以下几点：对加氧酶的需求，导致开环的起始反应以及所形成的能够进入中心代谢途径的产物。

（张 峻 译，马 挺 校）

18

微生物生态学方法



在微生物生态学中，我们可以利用荧光细菌作为鉴定和计数的方法。有些情况，需要非常特殊的菌株来鉴定某些特殊的生物，而在其他情况中，普通的菌株就足够用以环境中的细胞计数。图中我们使用非特异性染料 DAPI 给细胞染色，它能将细胞中的 DNA 染成蓝色并使细胞更易于计数。

词汇表

变性梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）：一种能够使大小相同但序列不同的核酸片段分离开来的电泳技术

DAPI：一种用于自然样品中菌体染色以计算总细胞数的非特异性荧光染料

富集偏差（enrichment bias）：液体富集培养中存在的一种问题，即接种物中含量最多或具有生态意义的生物体通过富集往往无法成为优势群体

富集培养（enrichment culture）：利用高选择性培养方法从自然样品中获得实验室培养用的微生物菌体的一种方法

环境基因组学（environmental genomics）：使用基因组学方法（测序及分析基因组）以确定天然微生物的群落特性

荧光原位杂交（fluorescent *in situ* hybridization，FISH）：在富集物中使用共价结合荧光染料的特殊核酸探针来鉴定和示踪生物体

绿色荧光蛋白（green fluorescent protein）：一种能使细胞呈现绿色并能够在环境中用于示踪生物体的荧光蛋白

同位素分部分离（isotope fractionation）：利用作用于 C 或 S 不同同位素中较重的同位素的酶来分辨，并使得 CO_2 或者 SO_4^{2-} 代谢中各自较轻的同位素得到富集

激光镊子（laser tweezers）：使用具有激光束的光学装置将单个细胞从细胞中分离并转移到无菌培养基中以获得纯培养物的设备

宏观基因组（metagenome）：在特定环境中存在的全部基因组成

显微放射自显影术（microautoradiography，MAR）：在曝光成像感光乳剂中对可见细胞放射性底物吸收的检测技术

微生物生态学（microbial ecology）：对微生物之间及其与环境之间的相互作用的研究

微电极（microelectrode）：可以在微生物群落中以微尺度间隔检测 pH 或特殊化合物如 O_2 或 H_2S 的一种小玻璃电极

稀释频度法（most probable number，MPN）：连续稀释自然样品以确定其生长的最高稀释度

核酸探针（nucleic acid probe）：一种寡核苷酸，通常 10～20 碱基大小，与目标基因的一段序列互补

Winogradsky 柱（winogradsky column）：用淤泥填充并覆盖上水以模拟湖的一种柱子，经过几个月能生长出各种细菌

微生物生态学（microbial ecology）是研究微生物体如何相互作用及其与环境之间相互作用的学科。微生物生态学的研究焦点就在于生物多样性（biodiversity）和微生物活性（microbial activity）。要研究生物的多样性，生态学者必须分离、鉴定和定量检测不同生境中的微生物。而要研究微生物的活动，就必须具备能够检测微生物在生境中生命活动的技术。本章将探讨生态学者用以研究微生物多样性和活动的方法。

本章所介绍的方法包括富集和分离、非特殊和特殊的细胞染色方法、基因分离和鉴定，以及原位（在自然环境中）检测微生物体活性的方法。第 19 章将会讨论更大范围微生物群落（如土壤和水体）及更特别的生境（如反刍动物的瘤胃或者豆科植物的根瘤）的生态学。利用本章所列出的方法，微生物生态学者能够对微生物群落的结构和功能提出更复杂的问题。

I 微生物群落培养的分析方法

自然环境中只含有单一类型微生物的情况很少，自然界中的微生物是以微生物群落的形式存在（见 19.1 节和图 19.1）。因此，微生物生态学者开发了用以剖析微生物群落的方法，即分离和鉴定微生物群落的组成。

18.1 富集与分离

一种研究微生物生态系统的方法是将微生物从系统中分离出来，在实验室环境中培养并研究它的特性。这个过程包括从群落中获得所感兴趣的生物，即富集（enrichment），接着通过纯培养分离到所感兴趣的生物。分离之所以重要，是因为它可以为实验研究以及生物技术、工业和环境微生物生态学等领域的应用提供所需要的培养物。

一种用于从自然中分离微生物的常用方法是富集培养技术。在富集培养（enrichment culture）中，确定目的生物需要的选择性培养基和培养条件以筛选所需要的生物，对不需要的生物进行反选择。有效的富集培养需要复制与特殊小生境尽可能一致的资源和条件。目前已经列出了成百上千的富集方法，而表 18.1 提供了一些成功的例子。

表 18.1 原核生物的一些富集培养方法[a]

光-光合营养细菌：主要碳源，CO_2			
空气培养		**富集生物**	**接种物**
N_2作为氮源		蓝细菌	池塘或湖水；富含硫化物的淤泥；死水；污水；潮湿、腐败的枯叶落叶；暴露在阳光下潮湿的土壤
NO_3^-作为氮源，55℃		嗜热蓝细菌	温泉微生物醭
厌氧培养			
H_2或有机酸；N_2作为唯一氮源		紫色非硫细菌，螺旋杆菌	上述某些接种物；下层滞水带湖水；巴氏消毒的土壤（螺旋杆菌）
H_2S作为电子供体		紫色和绿色硫磺细菌	
无光-化能无机营养菌：主要碳源，CO_2（培养基必须没有有机碳）			
空气培养：有氧呼吸			
电子供体	**电子受体**	**富集生物**	**接种物**
NH_4^+	O_2	亚硝化细菌（亚硝化单胞菌属）（*Nitrosomonas*）	土壤、淤泥；污水管流出物
NO_2^-	O_2	硝化细菌（硝化杆菌属）（*Nitrobacter*）	
H_2	O_2	氢细菌（各种属）	
H_2S，S^0，$S_2O_3^{2-}$	O_2	硫杆菌属（*Thiobacillus* spp.）	
Fe^{2+}，低 pH	O_2	氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）	
厌氧培养			**接种物**
S^0，$S_2O_3^{2-}$	NO_3^-	脱氮硫杆菌（*Thiobacillus denitrificans*）	淤泥、湖泊沉积物、土壤
H_2	NO_3^-＋酵母抽提物	脱氮副球菌（*Paracoccus denitrificans*）	

续表

无光-化能有机营养菌和产甲烷菌：主要碳源，有机化合物			
空气培养：有氧呼吸			
电子供体和氮源	**电子受体**	**典型富集生物**	**接种物**
乳酸盐＋NH_4^+	O_2	荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）	土壤；淤泥；湖泊沉积物；腐烂的植被；巴氏消毒的接种物（80℃，15min）用于所有芽孢杆菌富集
苯甲酸酯＋NH_4^+	O_2	荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）	
淀粉＋NH_4^+	O_2	多黏芽孢杆菌（*Bacillus polymyxa*），芽孢杆菌其他种	
乙醇（4%）＋1%酵母抽提物，pH 6.0	O_2	醋杆菌属（*Acetobacter*），葡糖杆菌属（*Gluconobacter*）	
尿素（5%）＋1%酵母抽提物	O_2	脲芽孢八叠球菌（*Sporosarcina ureae*）	
碳氢化合物（如矿物油，汽油，甲苯）＋NH_4^+	O_2	分枝杆菌属（*Mycobacterium*），诺卡氏菌属（*Nocardia*），假单胞菌属（*Pseudomonas*）（图 19.42）	
纤维素＋NH_4^+	O_2	噬纤维菌属（*Cytophaga*），生孢噬纤维菌属（*Sporocytophaga*）（图 12.90）	
甘露醇或苯甲酸酯，N_2作为氮源	O_2	固氮菌属（*Azotobacter*）	
厌氧培养：厌氧呼吸			
电子供体	**电子受体**	**富集生物**	**接种物**
有机酸	KNO_3（0.2%）	假单胞菌（*Pseudomonas*）（反硝化的种）	土壤、淤泥；湖泊沉淀物
酵母抽提物	KNO_3（1%）	芽孢杆菌（*Bacillus*）（反硝化的种）	
有机酸	Na_2SO_4	脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*），脱硫肠状菌属（*Desulfotomaculum*）	
乙酸盐，丙酸盐	Na_2SO_4	脂肪酸氧化硫酸盐还原菌	上述接种物；或是污水管的污泥；瘤胃内容物；海底沉积物
乙酸盐，乙醇	S^0	脱硫单胞菌属（*Desulfuromonas*）	
乙酸盐	Fe^{3+}	土杆菌属（*Geobacter*），*Geospirillum*	
乙酸盐	ClO_3^-	各种氯酸盐还原菌	
H_2	Na_2CO_3	产甲烷菌（仅限光能无机营养菌的种），同型乙酸细菌	淤泥、沉积物、污水管污泥
CH_3OH	Na_2CO_3	巴氏甲烷八叠球菌（*Methanosarcina barkeri*）	
CH_3NH_2或CH_3OH	KNO_3	生丝微菌属（*Hyphomicrobium*）	

续表

厌氧培养:发酵			
电子供体和氮源	**电子受体**	**富集生物**	**接种物**
谷氨酸或组氨酸	无外源电子受体加入	假破伤风梭菌(*Clostridium tetanomorphum*)	淤泥、湖泊沉积物;腐烂的植物;乳制品(乳酸或丙酸菌);瘤胃或肠的内容物(肠细菌);污水管污泥;土壤
淀粉+NH_4^+	无	梭菌(*Clostridium*)	
淀粉+N_2作为氮源	无	巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)	
乳酸盐+酵母抽提物	无	韦荣氏球菌(*Veillonella* spp.)	
葡萄糖或乳糖+NH_4^+	无	埃希氏菌属(*Escherichia*),肠杆菌属(*Enterobacter*),其他发酵生物	
葡萄糖+酵母抽提物(pH 5)	无	乳酸菌(乳杆菌属)(*Lactobacillus*)	
乳酸盐+酵母抽提物	无	丙酸菌	
琥珀酸盐+NaCl	无	生丙酸菌属(*Propionigenium*)	
草酸盐	无	草酸杆菌属(*Oxalobacter*)	

a. 所有培养基必须含有无机盐中的一类，包括 N、P、S、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+}、Ca^{2+} 和其他微量元素（见 5.1～5.3 节）。某些生物可能会需要维生素或其他生长因素。此表格可作为富集方法的一个总结，但并没有提及如果可以获得适当的接种物，其培养温度对于分离嗜热菌（高温）、超嗜热菌（极高温）和嗜冷菌（低温）等菌种的影响，或者极端 pH 或盐分对其分离的影响。

接种物和富集培养结果

成功的富集培养需要一个适宜的可获得微生物的接种物（inoculum）（样品）。因此，进行富集培养首先要选择适宜的生境（表 18.1）。通过将接种物直接涂布在高选择培养基上并在特定的条件下培养并获得富集培养物。许多原核生物可通过这种方法分离得到。例如，富集培养技术的先驱，伟大的荷兰微生物学家 Martinus Beijerinck（见 1.6 节）利用典型的富集方法第一次成功地分离到一种固氮细菌——固氮菌（*Azotobacter*）（图 18.1）。由于固氮菌属能固定空气中的氮，因此富集培养使用了缺乏氨或其他形式结合氮的培养基并在空气中培养，以此作为对该生物的强选择压力。而非固氮菌或厌氧固氮菌在这个例子中被淘汰（图 18.1）。

必须强调的是，培养基和培养条件对于成功的富集培养都是非常重要的。因此，为了更容易获得所感兴趣的生物，必须选择最佳的资源和条件。有时富集培养得不到所要的微生物，这可能意味着生境中缺乏微生物所需的一些特性，另一方面也可能意味着该生物是存在的，只是由于培养条件不足而无法得到富集。因此，富集培养可以提供阳性结果，但并不意味没有阳性结果就一定是阴性。而且，从富集培养中分离到所需要的生物并不能说明该生物在生物群落中的生态重要性，或者它是大量存在的。一个阳性富集仅能证明该生物存在于样品中，并且理论上只需要一个活细胞存在于样品中即可获得。

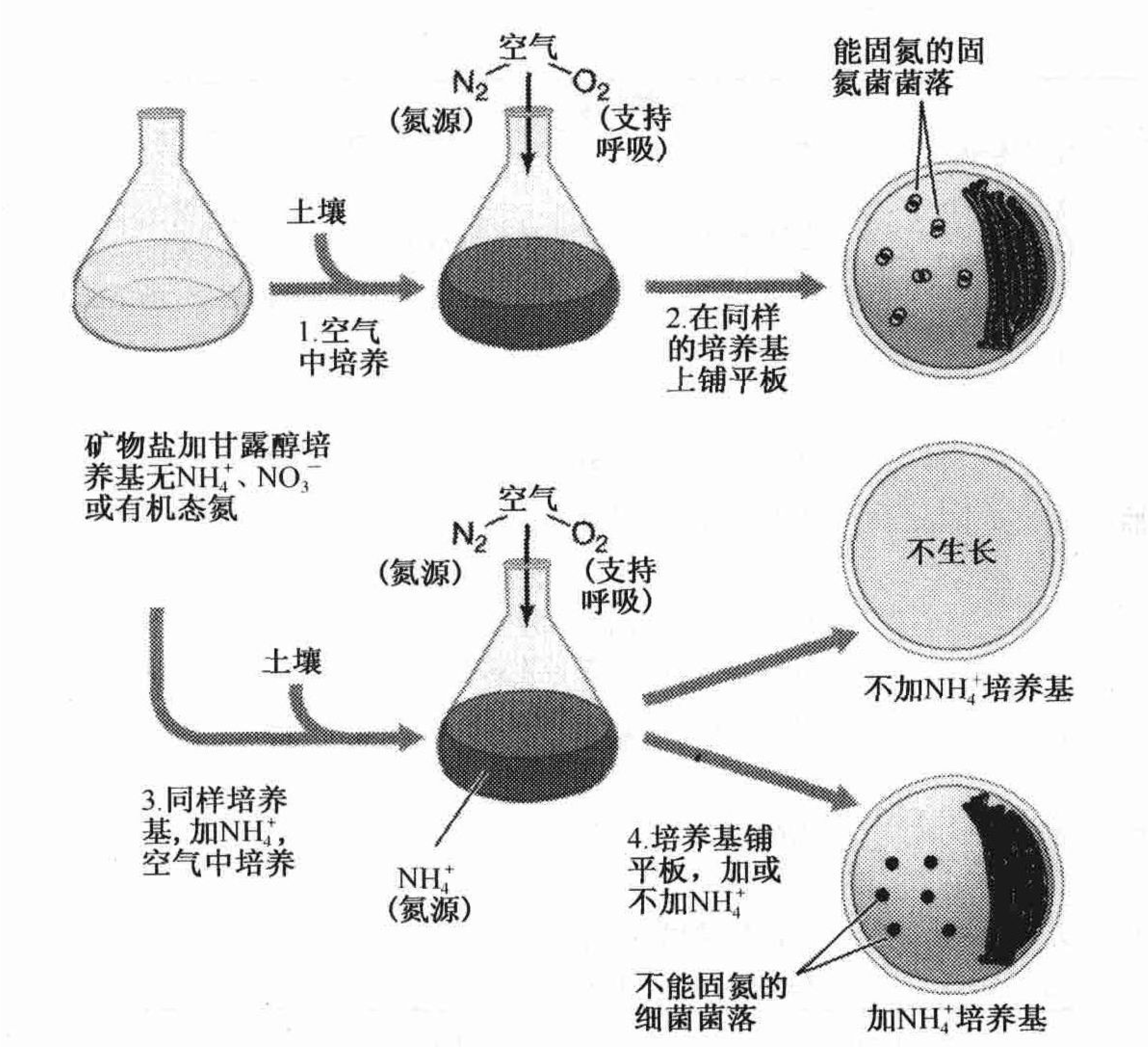


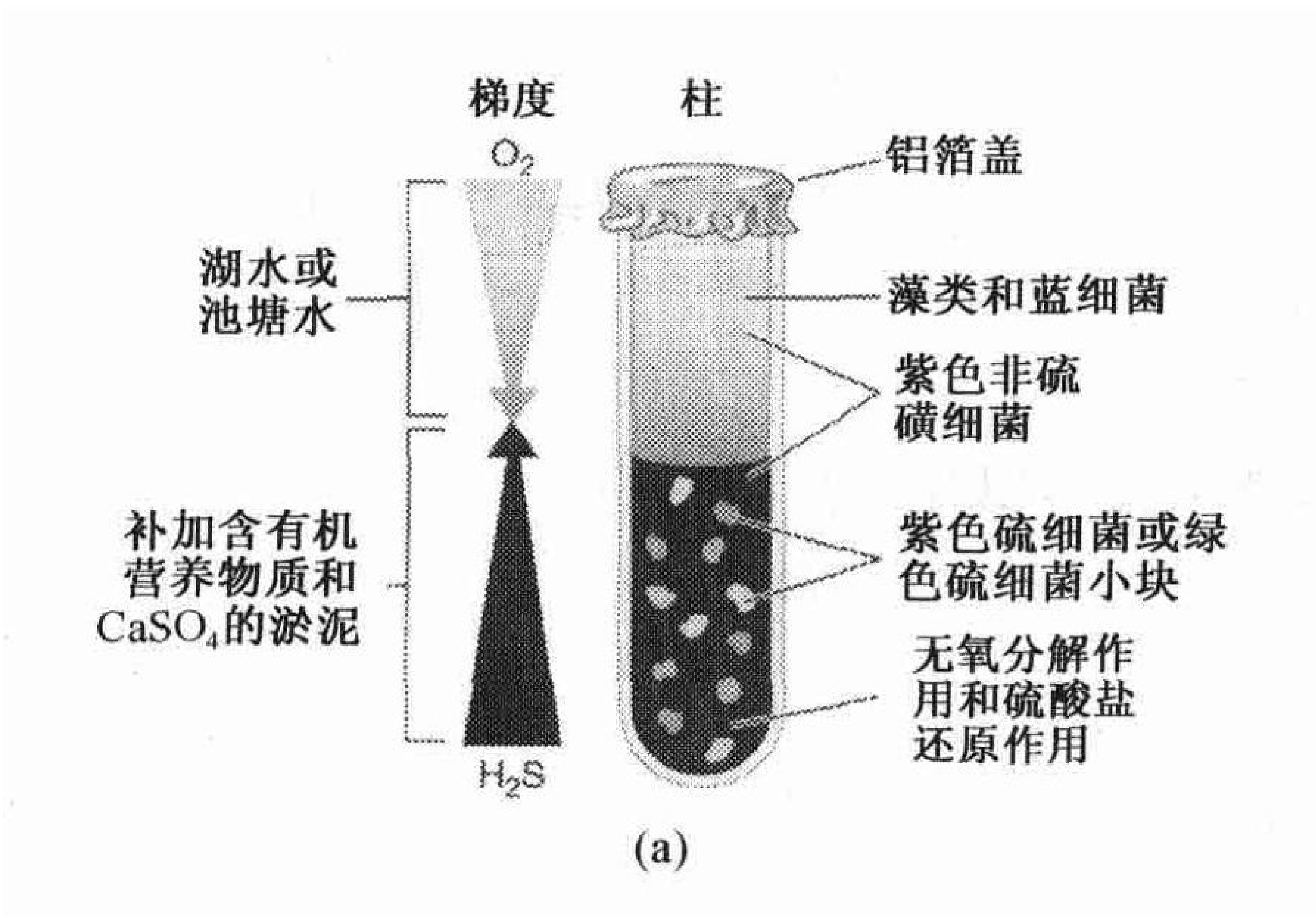
图 18.1 固氮菌的分离。筛选需氧固氮菌通常会分离到固氮菌或它的亲系。与此对比，利用固态氮如 NH_4^+ 的富集往往得不到固氮细菌，这是由于丧失了固氮的选择压力。

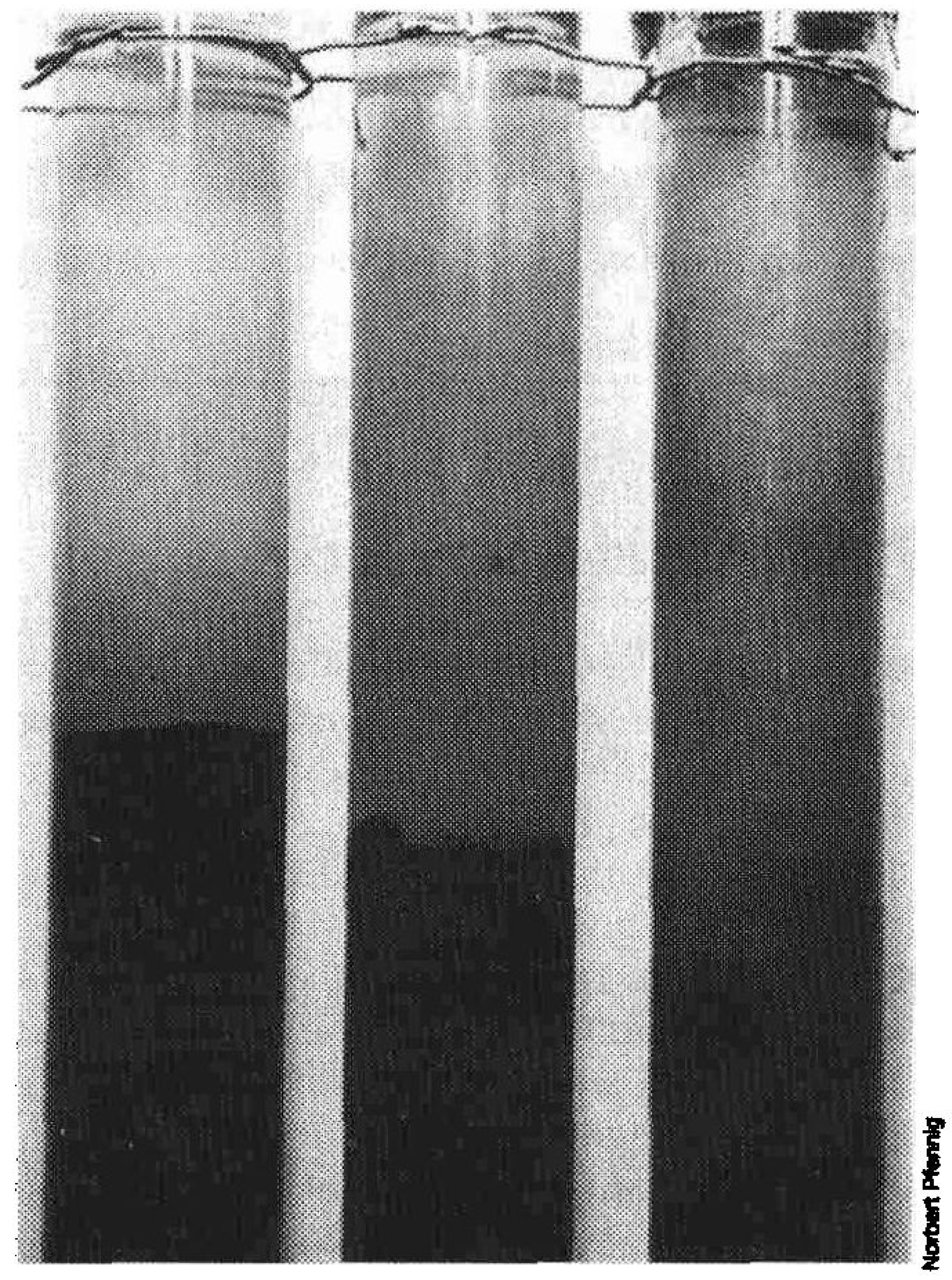
Winogradsky 柱

Winogradsky 柱（Winogradsky column）是一个小型的厌氧生态系统，它可以作为富集培养细菌的一个长期资源。该柱能用于分离紫色和绿色光合营养细菌、硫酸盐还原细菌以及其他许多厌氧菌（图 18.2）。它是由前苏联著名的微生物学家 Sergei Winogradsky（见微生物工具栏，Winogradsky 的遗产，第 17 章，1.7 节）命名，并于 19 世纪末首次用于土壤微生物的研究。

Winogradsky 柱是在一个玻璃圆柱体内填上约 1/2 的有机物，最好是含硫化物的淤泥（图 18.2）。首先将含碳物质与淤泥混合，该物质决定了哪种生物能被富集，但要避免使用发酵基质（导致产生过量的气体）。淤泥中还可以补加 $CaCO_3$和 $CaSO_4$分别作为缓冲液和硫酸盐的来源。把淤泥紧紧填入容器中，避免产生气泡（图 18.2），然后在淤泥上面覆盖湖水、池塘水或沟渠水（如果要制作类似海洋柱子则可以加入海水），最后将圆柱体顶部密封以免水分蒸发。将圆柱体放在窗户处以获得充足的阳光，放置几个星期。

在一个典型的 Winogradsky 柱内，可生长不同类型的生物体。在水柱的上层很快出现藻类和蓝细菌，并且由这些生物产生的 O_2形成有氧区。淤泥的分解过程可导致有机酸、乙醇和 H_2的产生，这些基质适合硫酸盐还原菌的生长（见 12.18 节、13.7 节、17.15 节和 19.13 节）。这些硫酸盐还原菌产生的硫化物会促进紫色和绿色硫细菌（厌氧光合细菌，见 12.2 节和 12.32 节）的生长，它们利用硫化物作为光合作用电子供体。这些生物一般会出现在柱子边缘的淤泥中，如果缺乏需氧光合营养细菌，它们也可能会





(b)

图 18.2　Winogradsky 柱。（a）一个典型柱的示意图。柱放在能见到适量阳光的地方。化能有机营养菌生长在整个柱子内，需氧菌和微需氧菌在上部，厌氧菌在含有 H_2S 区域，无氧分解作用导致硫酸盐还原形成 H_2S 梯度，绿色和紫色硫细菌根据其对 H_2S 耐受力分布在不同层。（b）Winogradsky 柱的照片。整个柱都是无氧的，3 种不同的光合营养细菌的菌苔出现在淤泥和水柱上层。从左到右为：耶拿硫螺旋菌（*Thiospirillum jenese*）、奥氏着色菌（*Chromatium okenii*）（两者皆为紫色硫细菌，见 12.2 节）和泥生绿菌（*Chlorobium limicola*）（绿色硫细菌，见 12.32 节）。

在水中大量繁殖（图 18.2）。如果想要获得光合营养细菌，需在取样时把长的薄型吸管插入柱中，取出一些带颜色的淤泥或水。这些样品可用于显微镜观察，并且可以接种到富集培养基（表 18.1）上进行分离鉴定。

Winogradsky 柱法已经用于各种原核生物的富集，包括需氧菌和厌氧菌。这个柱除了能够为富集培养提供准备好的接种物，还可以用特定化合物来填充，以检测柱中的生物体或生物群体能否降解该化合物。一旦获得初始富集物，便可以进一步进行纯化，这将在 18.2 节中进行讨论。

富集偏差

虽然富集培养是一个相当有用的方法，但是其结果中的大部分富集物都会存在一定的偏差，甚至有时形成很严重的偏差。在典型的液体富集培养中，大部分符合一定选择条件的微生物都能成为优势菌株。然而不幸的是，大部分符合实验室培养条件的微生物可能只是微生物生态系统中的次要组成成分，而不是其中的主要成分或最具有生态相关性的微生物。

富集偏差（enrichment bias）能够通过比较稀释培养（见 18.2 节）与传统液体富集结果而得到证明。稀释后富集或直接涂平板常常能比不稀释接种物的液体富集获得更多不同的微生物。可以认为稀释消除了无意义的数量干扰，使得接种物中的“种子”得

到迅速的生长，以便促进微生物群落中其他成员生长。因此接种物的稀释已成为现在富集培养微生物学的一个常规操作。

概念检查

富集培养技术是从自然样本中获得微生物的一种方法。通过选择针对某种特定微生物的培养基和培养条件可以研究特异性反应。

◆ 描述 Beijerinck 分离固氮菌的富集策略。

◆ 为什么要在 Winogradsky 柱中加入硫酸盐（SO_4^{2-}）?

◆ 什么是富集偏差?

18.2 纯培养中的分离

纯培养（pure culture）——培养物中只含有单一种类的微生物，它能通过许多方

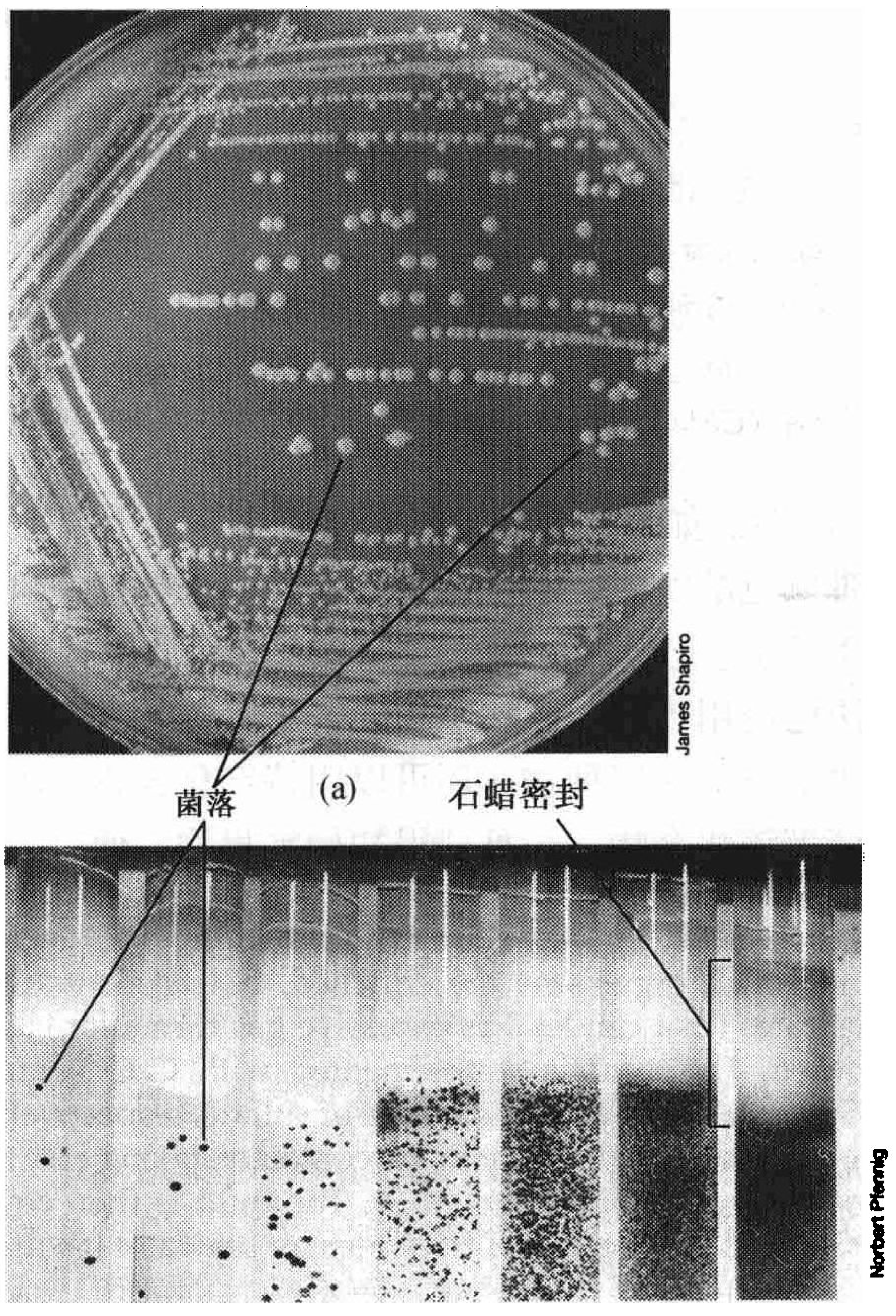


图 18.3 纯培养方法。(a) 图中所示，在平板上形成明显菌落的微生物很容易被纯化。(b) 使用琼脂振荡技术获得氧敏感型厌氧菌菌落。从右到左系列稀释，最终产生较好分离的菌落。用无菌混合的石蜡和矿物油密封试管以保持厌氧条件。

法从富集物中获得。一般的分离过程包括平板划线法、琼脂振荡法和液体稀释法。由于生物体在琼脂平板上生长得很好，所以平板划线法是普遍选择的方法（图 18.3a）。通过反复挑选和划线所分离的菌落，通常可以得到纯培养物，然后把这个纯培养物转移到液体培养基中。在适当的培养条件下（如用于厌氧菌的厌氧瓶，见 6.13 节），通过平板划线法可在琼脂平板上纯化需氧菌和厌氧菌。

琼脂振荡法和稀释频度法（MPN 法）

琼脂振荡试管法是在含熔化的琼脂试管中混合不同稀释度的培养物，其产生的菌落包埋在琼脂中而不是生长在琼脂平板的表面（图 18.3b）。这种试管振荡法对于纯化厌氧原核微生物（如光合营养硫细菌）以及 Winogradsky 柱（图 18.2）中的硫酸盐还原菌（图 12.50g）是非常有用的。可以通过在含有液体培养基的试管中连续稀释细胞悬浮液使其获得纯化（图 18.3b）。单个克隆菌落作为接种物，进行新一轮稀释，以最高稀释度上获得单个克隆，重复上述步骤，最终可达到纯培养。

一个相似的过程是在液体培养基中将接种物连续稀释，直到这一系列最后的试管不显示生长为止（图 18.4）。例如，利用 10 倍连续稀释，最后一个试管则表明是从 10 个或更少的细胞中稀释获得的，这个方法就称为稀释频度法（most probable number，MPN）（图 18.4），该技术可以在常规检测中用于估算食物、废水和其他样品中微生物的细胞数量。MPN 法可以利用高选择性培养基和培养条件，以确定一个微生物或一个微生物小群体（如某些特殊的病原菌），或利用复杂的培养基来估算细胞总数（但要参照 6.7 节）。

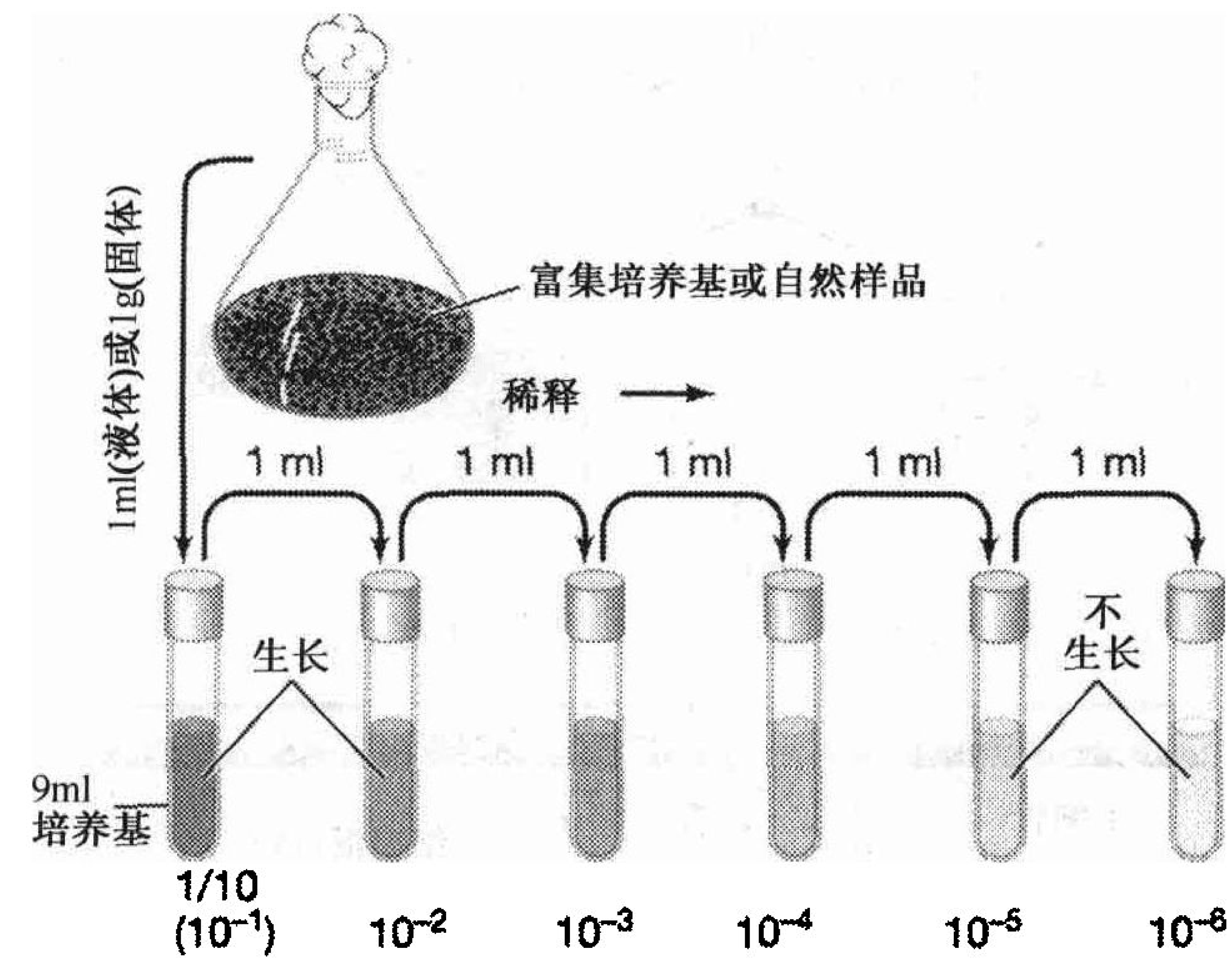


图 18.4 稀释频度法（MPN 法）分析过程。将富集培养物或水体、土壤等自然样品加入到选择培养基中，进行连续稀释。最后一个显示生长的试管（图中显示为 10^{-5} 稀释度）应该是从 10 个或更少的细胞中生长得到的。作为获得纯培养物的方法，显示生长的最高稀释度可用作接种物，并重复上述过程。而作为估算样品中某种特定类型的细菌数量的方法时，MPN 定义为显示生长的最高稀释度。例如，如果本图中的培养基是用于硫酸盐还原菌的高选择培养基，则该菌在样品中的可培养细胞数量为 10^5～10^6 个/g。每个稀释度上做几个重复能提高最终 MPN 的精确度。

这个方法用于纯化培养物，一旦获得所推测的纯培养物，就有必要检测其纯度。一

般步骤为：①镜检；②在平板或摇瓶上观察菌落特征；③在其他培养基上检测培养物的生长情况。在随后的步骤里，还必须在不利于目的培养物生长而有利于污染菌生长的培养基上检测纯培养物的生长情况。最终分析时，只要显微观测的单一细胞形态特征与菌落特征一致，并且在不同培养基上的生长测试表明不存在污染菌，就能很好地证明该培养物是无杂菌的纯培养物。

纯培养的探针——激光镊子

除了所述的经典方法外，显微技术的发展为我们获得纯培养提供了新工具，如激光镊子（laser tweezers）。

激光镊子包括一个光转化显微镜和一个显微操作装置，其中显微镜安装了强聚焦红外激光束发射装置（图 18.5）。视野中的单一细胞能够被激光束捕获并将其从周围的微生物中分离开来，这些过程都是可见的。激光捕获是由于激光能对小物体（如微生物的细胞体）产生一种牵引力，并将其固定在原地。当激光束移动时，被捕获的细胞也会随之移动。如果样品是在毛细管中，细胞被捕获后，在它与其他细胞之间将毛细管切断使之实现细胞分离。随后将捕获的细胞直接接入含有无菌培养基的小试管中，开始进行纯培养（图 18.5）。

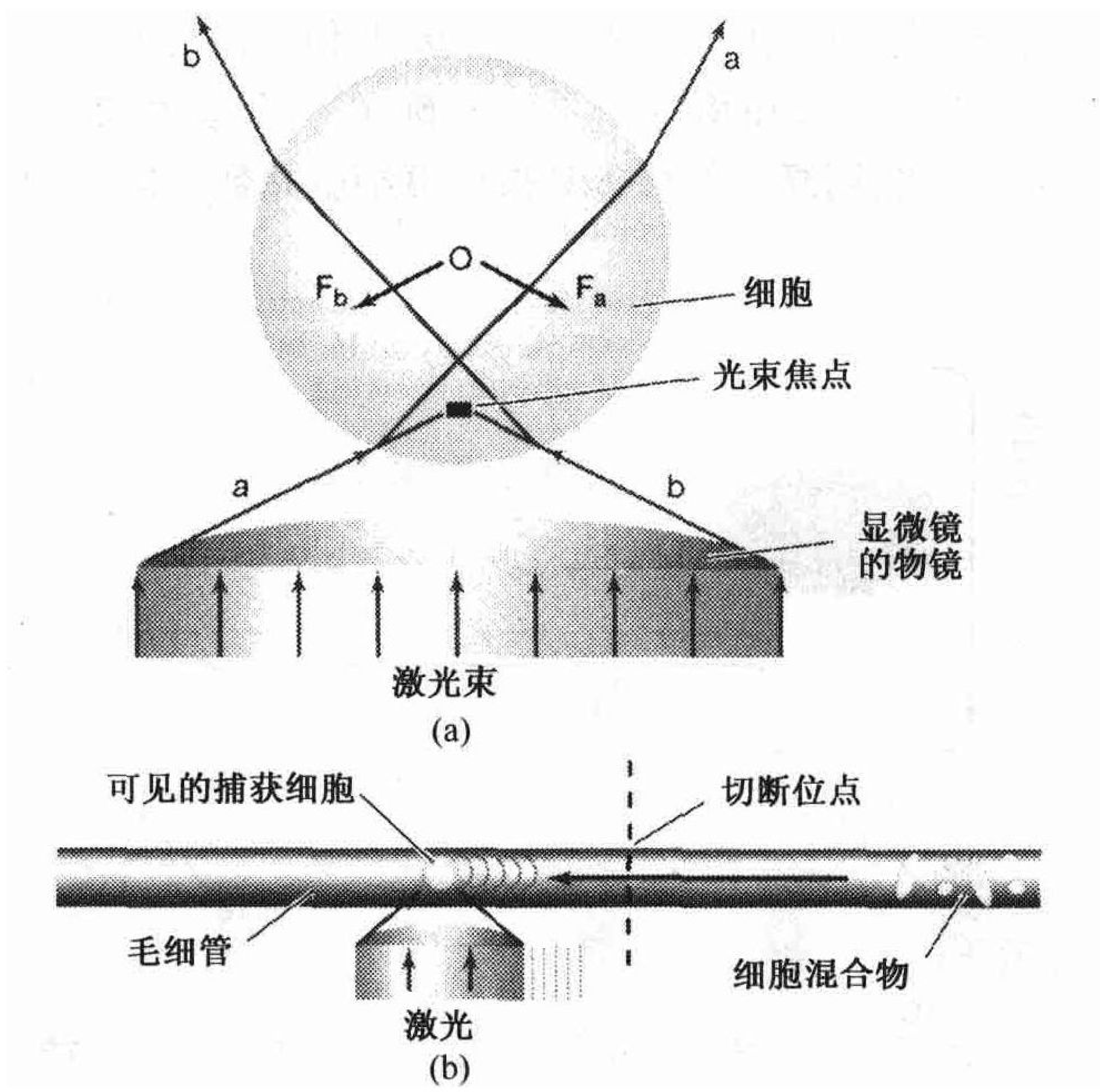


图 18.5　分离细菌的激光镊子。(a) 激光镊子的原理。一个强焦距激光束打在如细菌细胞般大小的物体上，产生向下的辐射力（F_a，F_b），能向任何方向牵引细胞。(b) 分离。激光束能在毛细管中固定住混合物中的一个细胞，并牵引这个可见的捕获细胞（本图是将该细胞从右拉到左），与其他细胞分离开来。一旦目的细胞远离了其他细胞，便切断毛细管并将细胞直接接入含无菌培养基的试管中。

激光镊子技术对于分离生长缓慢的细菌尤其有用，因为这些细菌可能会在富集培养中畸形生长，或者由于存在数量过少而在稀释富集培养中丢失。结合能在显微观察中鉴

定特定生物的特殊染色法（见18.4节），激光镊子能进一步将感兴趣的微生物从混合物中分离出来并进行更深入的实验研究。

概念检查

获得富集培养后，通常用传统的微生物学方法获得纯培养物，包括平板划线法、琼脂振荡法和液体稀释法。激光镊子能够在显微范围内"挑选"细胞，并像镊子一样将细胞从其他细胞中分离出来。

◆ 琼脂振荡法与划线法所分离获得的菌落有什么不同？

◆ 在MPN（图18.4）中，为什么每份样品中活细胞的实际数量介于显示生长的最高稀释度的倒数和下一个稀释度的倒数之间？

◆ 你如何从富集培养中将存在数量相对较少而形态上独特的细菌分离出来？

Ⅱ 微生物群落的分子分析法（非培养依赖法）

微生物生态学经常需要鉴定微生物生境中的细胞，以便确定是否存在特殊的生物及其数量。这些信息有利于了解生态系统的动态学以及精确确定最具生态学意义的微生物。细胞染色能帮助微生物学家获得这些数据，因此我们将详细描述这些方法。

自然环境中的微生物同样也能通过检测它们的基因来鉴定。在研究中经常以编码核糖体RNA（见11.5～11.7节）或特殊代谢过程的基因作为靶基因，而环境基因组学也在收集对微生物群落基因组不断尝试的新方法。

18.3 活体染色技术和定量方法

在微生物学中已经发明了一些染色方法用于自然样品中微生物的定量。虽然这些方法不能展现细胞的生理状态或系统发生，但它们可以广泛并相当可靠地获得部分生境中细胞总数等信息。

DAPI荧光染色

荧光染料被广泛应用于不透明生境中微生物的染色。DAPI（4′,6-二胺-2-苯基吲哚）就是该染色方法中很普遍的染料。DAPI能将细胞染成荧光亮蓝，使细胞易于观察和计数（图18.6）。因此，DAPI广泛用于环境、食物和临床样品中的微生物计数。

根据样品不同，非特异性背景染色有时会成为荧光染色的问题，但是只染色核酸的DAPI对大部分细胞内含物都不起反应。因此对于许多样品（如土壤和水体），利用DAPI染色能够对存在的细胞数量做出合理的估计。而对于淡水样品，过滤一定量的液体后，细胞能在过滤器的表面被染上颜色，或者将细胞离心浓缩后染色。一方面，像DAPI这样的染色技术具有非特异性染色的优点，它们能将样品中的所有微生物染色；另一方面，它们无法区分活细胞和死细胞，或者无法区分不同种类的微生物，因此不能用于环境中特殊微生物的示踪。

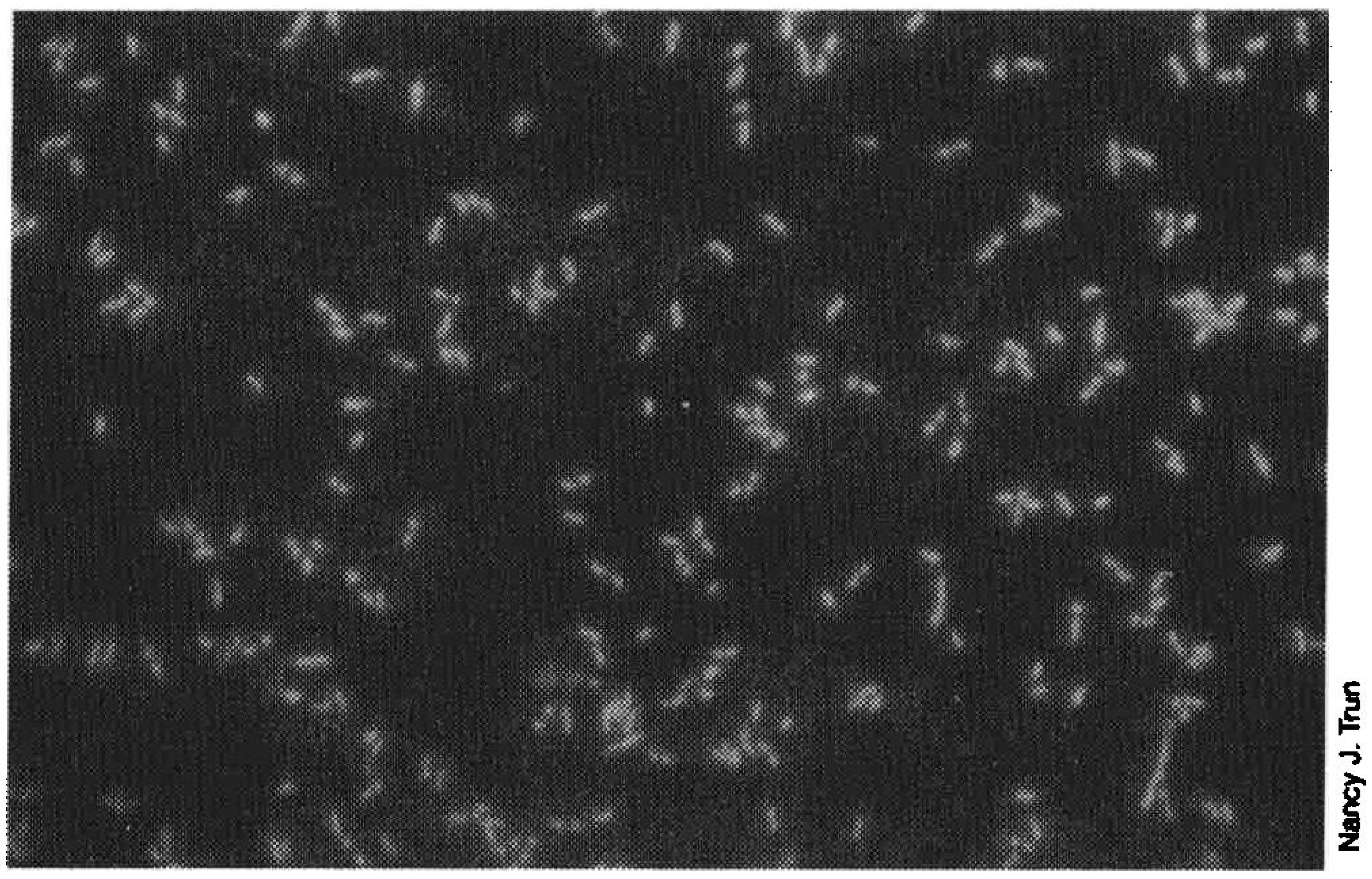


图 18.6　DAPI 的大肠杆菌（*Escherichia coli*）荧光染色。DAPI 染色技术是用于微生物总数计数的典型染色技术。DAPI 能渗透细胞并与 DNA 结合，将原核细胞统一染上荧光。

活体染色

目前已经发展了一种可将活菌细胞从死细胞中区分开来的荧光染色技术。这个技术不仅提供了样品中存在的微生物数量，还提供了它们的活性等信息。该技术是根据细胞膜是否完整鉴别细菌活性。将绿色和红色两种染料加入样品中，绿色荧光染料渗透所有的细胞，无论活细胞或死细胞，而含有碘化丙啶的红色染料只能渗透那些细胞膜不完整的死细胞，因此，绿色细胞是活的，而红色细胞是死的，这为判别活细菌提供了简便的方法（图 18.7）。虽然活/死细胞染色方法能用于实验室培养物的研究，但由于它会造成背景材料的非特异性染色，因此并不适用大部分自然生境的显微检测。

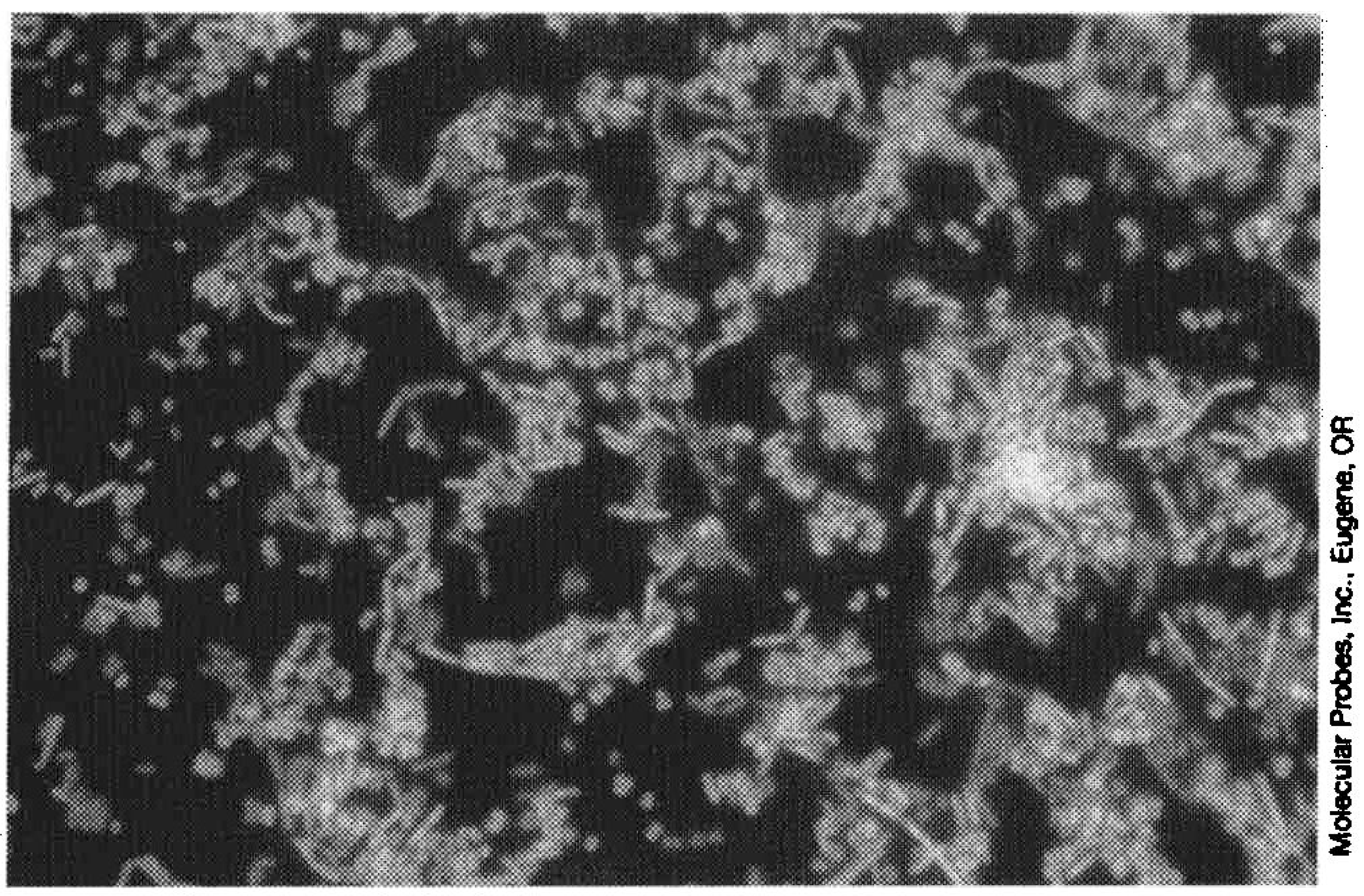


图 18.7　活性染色。藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）（球状）和蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）（杆状）使用 LIVE/DEAD Bac Light™细菌活体染色仪染色，绿色细胞为活细胞，红色细胞为死细胞。

荧光抗体

荧光抗体（fluorescent antibody）染色技术更具有特异性。抗体是一种特殊的生物反应制剂，我们将在24.9节中讲述荧光抗体的理论。利用抗体对特殊微生物细胞表面组分的特异性结合，能在含有许多微生物的复杂生境，如土壤（图18.8）或临床样品中用于某种微生物的鉴定和示踪。这种方法需要准备针对于所感兴趣微生物的特异性抗体，而这一过程比较耗费时间和精力。对于临床相关微生物来说，由于可以购买到商品化的高度特异性抗体，因此这个技术被广泛应用于临床微生物实验室研究（见24.9节和图24.9）。

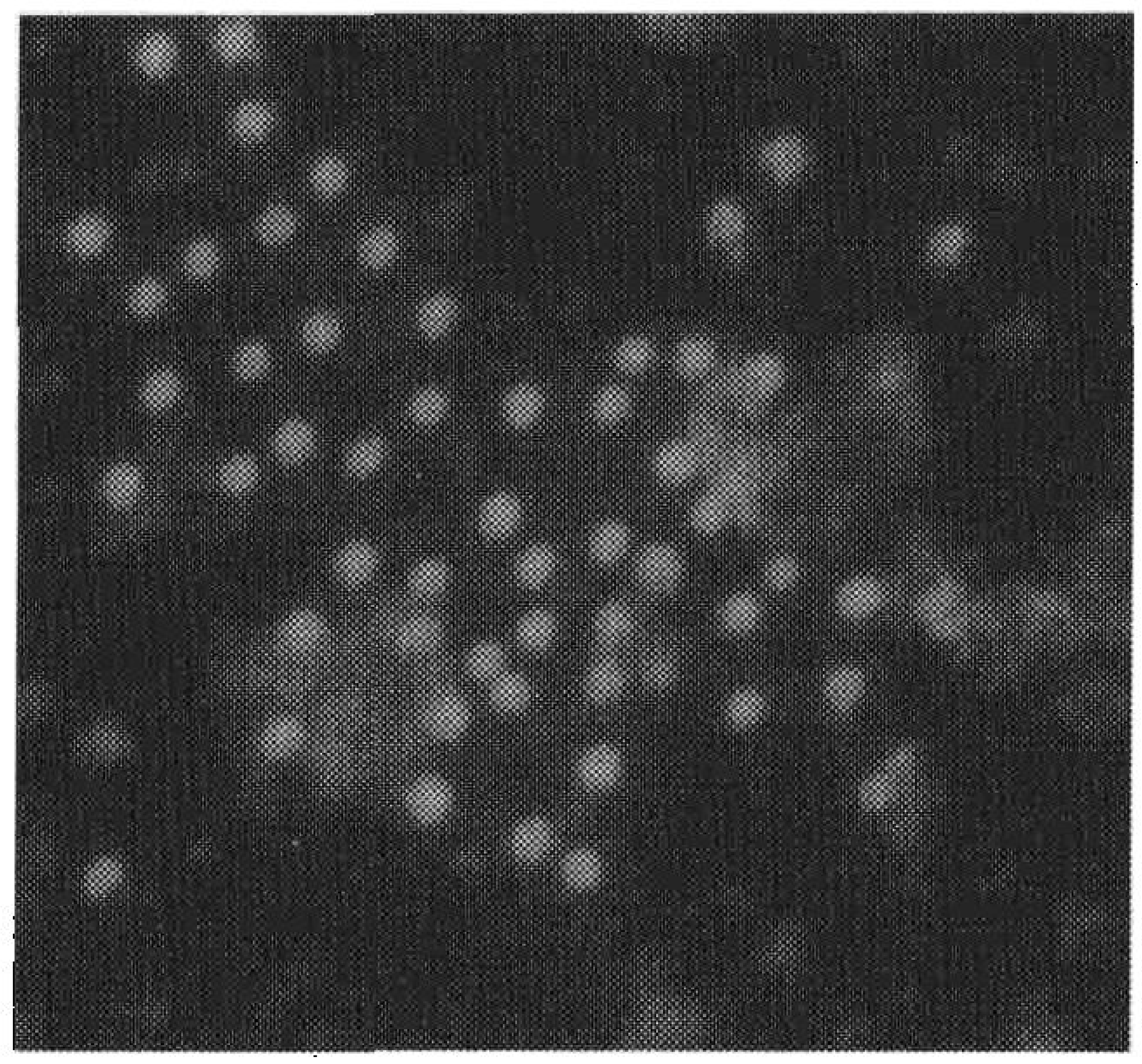


图18.8 用作细胞标签的荧光抗体。利用荧光抗体技术，使硫质土壤颗粒表面的超嗜热古生菌中的嗜酸热硫化叶菌（*Sulfolobus acidocaldarius*）微菌落细胞可见化，显示为黄绿色圆点。细胞直径大小约为1μm。

细胞标签——绿色荧光蛋白

细菌细胞能通过基因工程改造而使其发荧光。编码一种叫做绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）的基因片段能有效地插入到任何细菌的基因组中。基因表达时，含有GFP的细胞能在紫外显微镜下呈现绿色（图18.9）。



图18.9 绿色荧光蛋白（GFP）。经过基因工程改造后的荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*），细胞表达绿色荧光蛋白，并且能通过共聚焦激光显微镜观察（见4.2节）。这些细胞附在裸根上，并发出绿色荧光。蓝色细胞是根部正常菌群的一部分，被DAPI染成蓝色（见18.3节和图18.6）。利用GFP能示踪引入到环境中的细胞。

虽然该技术不能用于自然群落的研究（因为这些细胞缺乏GFP基因），但是可将带有GFP标签的细胞引入到环境中［如植物根部（图18.9）］，然后利用显微镜对标签菌体进行追踪。利用这个方法，微生物生态学家能研究自然微生物群落与GFP标签菌株

之间的微生物原位竞争，或是引入的细菌对环境的干扰作用。

编码 GFP 的基因作为报道基因（reporter gene），同样广泛用于各种细菌的实验室培养研究。将 GFP 基因与一个操纵子融合，使其表达受特定抑制子的控制，可以利用荧光作为转录的报告结果来研究所融合基因的转录控制情况，即当融合了 GFP 的基因转录时，GFP 基因同样会被转录，然后翻译表达绿色荧光蛋白，使细胞产生绿色荧光（见 31.4 节和图 31.7）。

显微术的局限性

显微镜对于自然样品中的微生物计数和鉴定非常具有使用价值，但是否足以满足自然生境中微生物的研究需求呢？答案是否定的，原因有如下几点。

细胞微小就是一个主要的问题。原核生物的尺寸差异很大（见 4.4 节和表 4.1），有些甚至接近光学显微镜分辨率的极限。在观察自然样品时，这样的微生物就很容易被忽略，尤其当样品含有大微粒物质或大量较大细胞时。另外，在自然样品中显微镜很难区分活细胞和死细胞，或者活细胞和其他无生命物质。即使观察目标是单一成分，所有这些因素都能影响甚至严重影响结果。

然而，目前我们所提到的染色法的最大局限可能就是无法衡量自然生境中微生物的多样性，换句话说，当我们在显微镜下计数细胞时，我们观察到的是哪些种类的微生物？单一的显微观察很容易产生这样的困惑。例如，细胞形态相似而在生态系统中的作用完全不同的两种微生物起源可能截然不同（图 18.10），而简单的染色方法并不能解决这样的问题。因此，在显微镜下观测无染色或非特异性染色的微生物自然群体时，应该意识到这个样品中肯定含有起源不同的微生物群落，即使它们的细胞“看上去”一样（图 18.10）。特异性染色可以揭示这个问题（图 18.10b）。

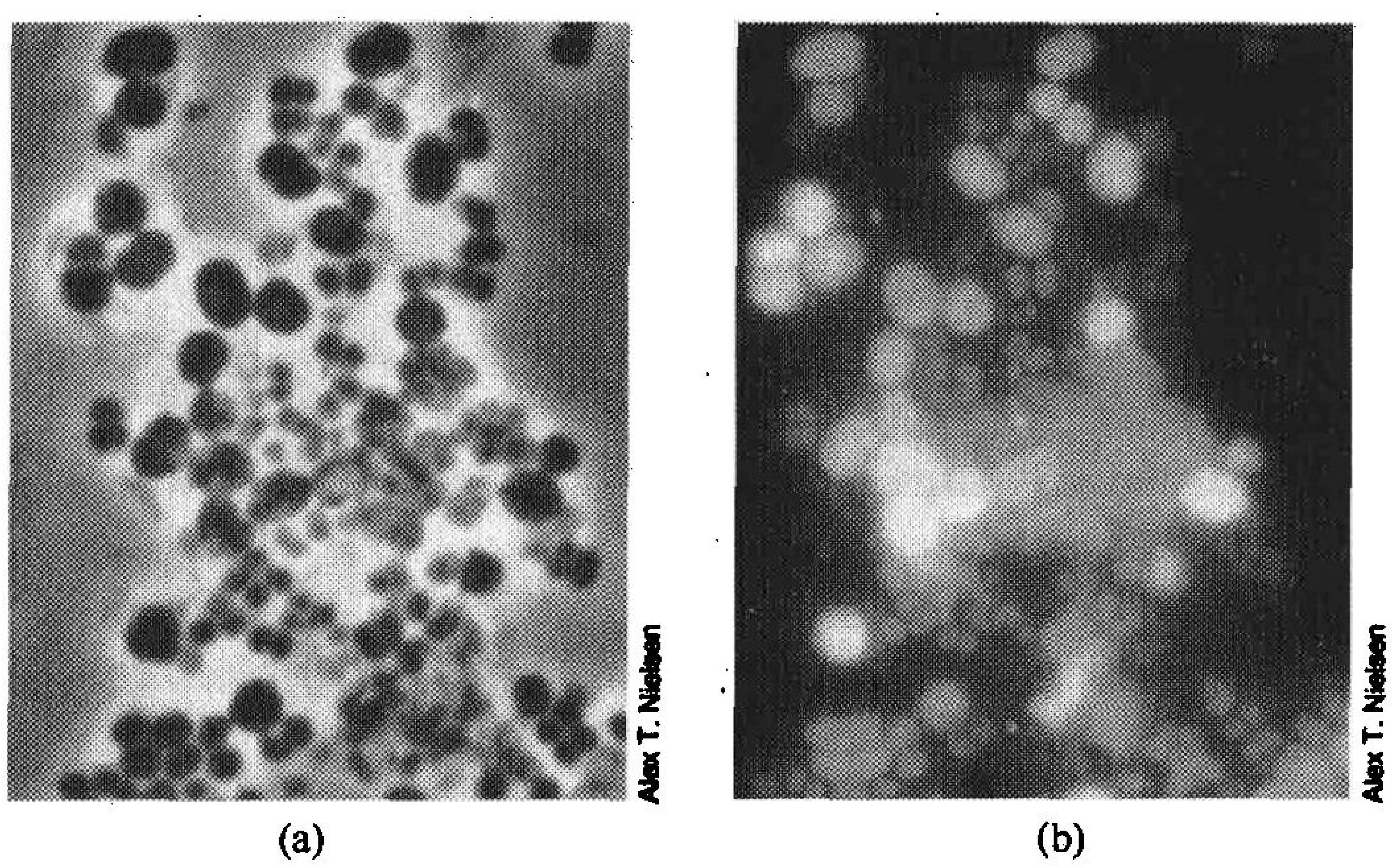


图 18.10 形态与起源的多样性。这里前后两张照片展示的是同一区域的细胞，(a) 相差和 (b) 系统发育染色（见 18.4 节）。尽管这些大的椭圆形细胞在形态和大小上与原核细胞很不相同，但在相差显微镜下它们看起来很相似。系统发育染色表明它们是两种起源截然不同的细胞类型（一种染成黄色，另一种为蓝色）。对于简单的光学镜检结果必须注明，因为它很容易将单一镜检区域中的相同形态的细胞假定为同一种微生物。染成蓝色或黄色的椭圆形细胞直径约为 2.25μm，而成对或成群的绿色细胞直径约为 1μm。

虽然显微镜是微生物生态学家的一个重要工具，但是想要真正了解生态系统，还必须补充培养方法和分子技术。分子方法的重点是将特殊基因与特定微生物相联系，该基因的存在同时表明了该微生物的存在。我们认为现有的分子生物学方法中，有些同样包括显微方法（图 18.10）。

概念检查

DAPI 是一种用于鉴定自然样品中微生物的普通染料。某些染色能区分活细胞和死细胞，并且还可以制备特异结合单一菌株或单一相关种群的荧光抗体。绿色荧光蛋白能使细胞自发产生荧光，可用作示踪引入环境中细胞的工具。与纯培养不同，在自然样品中，形态相似的细胞可能在起源上完全不同。

◆ 为什么称 GFP 是一种“染色”方法的说法并不正确?

◆ 如何像 DAPI 染色那样进行特异性染色，而不使用荧光抗体?

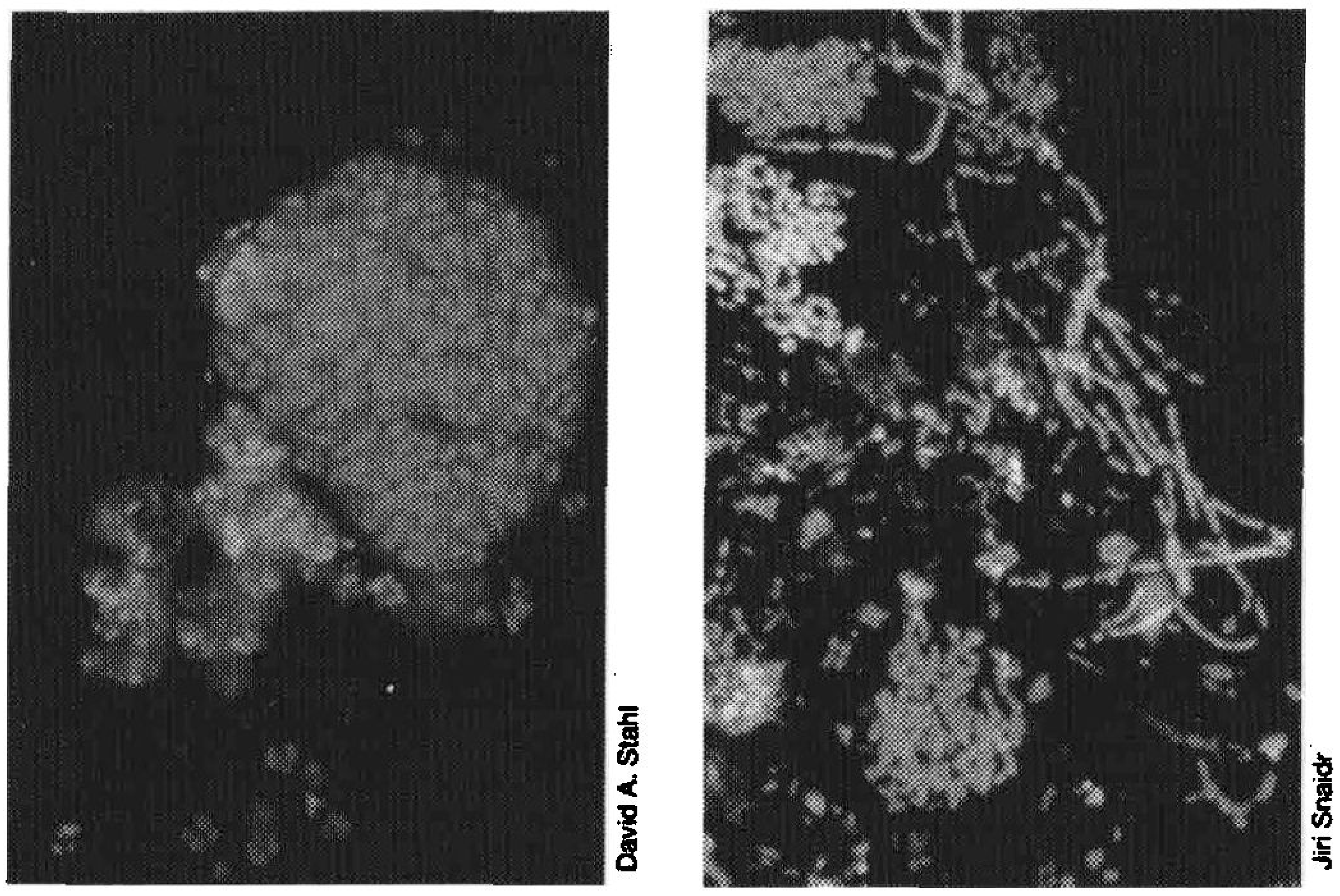
18.4 基因染色

鉴定和定量自然界中微生物的有效方法是核酸探针法。核酸探针（nucleic acid probe）是指与目的基因中一段序列互补的 DNA 或 RNA 寡核苷酸，它能与目的基因杂交（见 7.7 节和 11.7 节）。正如在 11.6 节中讨论的，寡核苷酸探针能与某些染料结合而产生荧光，因此，这些荧光探针能鉴定那些含有与探针互补的核酸序列的微生物。这个技术称为荧光原位杂交（fluorescent *in situ* hybridization，FISH）（见 11.6 节），在此将介绍该技术的 3 种不同应用。

利用 FISH 进行系统发育染色

系统发育染料（phylogenetic stain）是能与 16S（原核生物）或 18S（真核生物）核糖体 RNA 序列（见 11.7 节）互补的一段可发出荧光的寡核苷酸序列，它能渗透细胞并直接与核糖体 RNA 杂交（图 11.14）。由于系统发育探针既能根据单一微生物菌种也能根据整个微生物群体设计，因此系统发育染色能通过探针序列来控制其特异性程度。利用 FISH 可鉴定或示踪自然样品中的某种特殊微生物（或一组相关微生物，这取决于系统发育探针的特异性）。

同时还能使用多重系统发育探针来处理自然样品。FISH 可通过一组探针鉴定整个生境的系统发育特征，这组探针中的每个探针都只与一个或一组特定的微生物反应并且带有自己独特的荧光染料（图 18.11）。如果 FISH 与共聚焦显微镜结合（见 3.2 节），还可以在一定深度上开发微生物群体，如生物膜（见 19.3 节，图 18.11 和图 19.4）。除了微生物生态学，FISH 技术作为鉴定特殊病原菌的工具已经广泛应用于食品工业和临床诊断。



(a) (b)

图 18.11 污水的 FISH 分析。(a) 污水淤泥中的硝化细菌。红色为氨氧化($NH_3 \rightarrow NO_2^-$)细菌,绿色为亚硝酸盐氧化($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)细菌。对于这两种代谢型相近的菌种,可假设彼此间交换 NO_2^-,从生产者(氨氧化细菌)到消费者(亚硝酸盐氧化细菌)。(b) 污水淤泥样品的共聚焦激光扫描显微照。使用 3 种系统发育探针对样品进行处理,每种探针含有不同的荧光染料并且作用于不同的变形菌门(是细菌系统中几种主要谱系中的一种,见第 12 章)。绿色、红色和紫色细胞只作用了一种探针,而蓝色和黄色细胞因作用了两种探针而显示不同的颜色。

染色体彩绘及原位反转录

另外两种 FISH 技术是染色体彩绘(chromosome painting)和原位反转录(*in situ* reverse transcription,ISRT)。前一种技术用于鉴定自然样品中微生物群落的特殊基因,而后一种鉴定特殊 mRNA(即已经表达的基因)。

染色体彩绘是将一段寡核苷酸探针或者将一个完整基因、一系列基因、甚至整个基因组用一定方法消化得到的小探针与荧光标签结合,然后将这些探针与自然样品中微生物的 DNA 杂交(图 18.12a)。染色体彩绘一般用于鉴定含有特殊高度保守基因的细菌,如编码固氮酶基因(用于固氮,见 17.28 节)、编码光合作用反应中心的基因(无氧光合作用,见 17.4 节)、编码特殊自养途径的基因(CO_2 固定,见 17.6 和 17.7 节),在样品中根据荧光细胞的数目可分别估算固氮菌、光合细菌或自养菌的数目。

原位反转录(ISRT)FISH 与染色体彩绘不同,它用于检测自然样品中细胞的基因表达(图 18.12b,c)。这种方法使用一种可与样品细胞中已转录的特殊 mRNA 杂交的探针,一旦探针发生作用时,将进行反转录合成互补的 DNA,并通过聚合酶链式反应(PCR,见 7.9 节)扩增 DNA,随后扩增的 DNA 再与荧光探针反应(图 18.12b,c)。ISRT FISH 一般用于研究自然群体中控制基因表达的因子,并观察特殊基因转录对样品产生的影响。

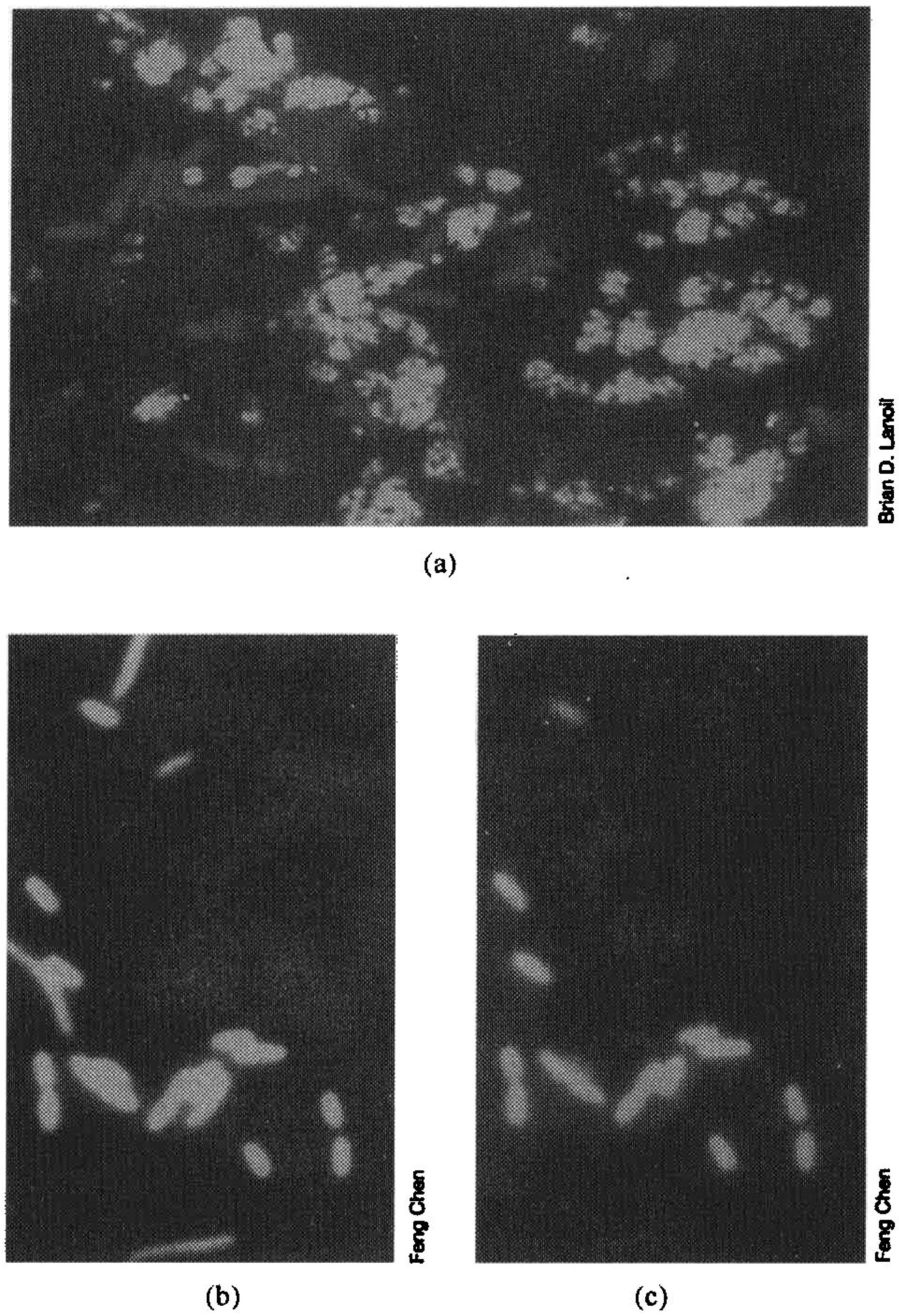


图 18.12 细菌染色体彩绘和原位反转录（ISRT）的荧光染色技术。（a）染色体彩绘。图为大肠杆菌（*Escherichia coli*）（红）和线性海洋螺菌（*Oceanospirillum linum*）（蓝）的混合物。每种结合了荧光染料的 DNA 寡核苷酸是针对相应微生物基因组 DNA 制备的。因为每种生物的基因组中具有重要意义的序列都不同，因此标签基因只能与其对应的生物基因组杂交。（b、c）ISRT。这两张照片显示的是水解微泡菌（*Microbulbifer hydrolyticus*）（短粗杆状）和星箭头菌（*Sagittula stellata*）（长细杆状）的混合培养物。水解微泡菌特殊 mRNA 通过 PCR 反转录合成 cDNA，并与荧光标记的探针杂交。（b）所有细胞都用 DAPI 进行非特异性染色（图 18.6）。（c）细胞用 ISRT 探针染色。ISRT 数据有助于了解在微生物群落中哪种微生物具有特殊的代谢活动。

概念检查

一些荧光染色利用核酸探针使其具有高度特异性。这些染色方法包括系统发育染色，染色体彩绘和反转录荧光原位杂交（FISH）。

◆ 在系统发育 FISH 中，细胞的哪个部位是荧光探针作用的标靶？

◆ 染色体彩绘和 ISRT FISH 展示了自然样品中细胞的哪些不同部分？请解释。

◆ 请问你会使用哪种荧光技术来估计土壤样品中固氮细菌的数量？

18.5 利用 PCR 将特定基因连接到特定微生物体中

对于许多生态学研究来说并不需要分离微生物体，甚至不必使用 18.3 和 18.4 节中所提到的染色方法对微生物进行计数和镜检鉴定。我们可以不用培养或其他观察细胞的方法就能检测生境中的生物多样性。为此，我们规定了一些特殊基因作为检测微生物群落生物多样性的标准。其基本原理如下，特殊基因常常与特殊微生物相关，因此检测到该基因就意味着该微生物体的存在。这种微生物群落分析方法使用的主要技术有聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）、变性梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）或分子克隆（molecular cloning），以及 DNA 测序分析（DNA sequencing and analysis）。另外，我们还可以利用基因组技术来鉴定微生物群落的组成。

聚合酶链式反应和微生物群落分析

我们已经在第 7 章中讨论了 PCR 的原理（见 7.9 节）。PCR 的主要步骤是：①两个核酸引物与目的基因的互补序列杂交；②DNA 聚合酶复制目的基因；③重复互补序列变性、引物结合和基因合成步骤获得多拷贝目的基因（图 7.28）。一个基因的单拷贝能复制出几百万个拷贝（图 18.13）。

哪种基因能作为靶基因？通常使用编码 16S 核糖体 RNA 的基因。16S rRNA 序列分析能追溯微生物纯培养的系统进化关系起源（见 11.5 节和图 11.13）。同样的，根据微生物群落中复制得到的 16S 基因的序列分析，能绘制出该群落的系统进化树（图 18.13）；或者在特殊生物（或一组相关生物）中编码独特代谢蛋白质的代谢基因也能作为目的基因。然而，除了用于 PCR 扩增的基因或基因群，还必须保证引物的特异性，引物设计对于自然样品 DNA 能够精确并高效地进行 PCR 是很重要的。

在典型的群落分析实验中，需要从微生物生境中分离得到群落总 DNA，而商业化的试剂盒可以从土壤或其他复杂生境中获得高度纯化的 DNA。所得到的 DNA 是存在于生境中所有微生物基因组 DNA 的混合物（图 18.13）。而 PCR 的工作就是从这些混合物中“钓到”目的基因并合成足够的拷贝用于序列分析。

图 18.13 显示了分子微生物群落分析的一系列过程，其最后结果就是凝胶上的目的基因带（图 18.13 和图 18.14）。只有出现既定大小（DNA 片段大小取决于两个引物之间的距离）的唯一一条带才算是理想的。如果测序是最终目的，那么 PCR 产物还需要筛选，而分离 PCR 产物的一个主要方法就是变性梯度凝胶电泳。

变性梯度凝胶电泳（DGGE）：分离相似基因

PCR 扩增利用单一一组 16S rRNA 引物从自然微生物群落中获得大小相同的 DNA 片段并出现单一的凝胶条带（图 18.13 和图 18.14a）。然而，这样的条带其实含有许多高度相似却不同的基因。这是因为尽管目的基因的引物位点高度保守，但引物位点之间

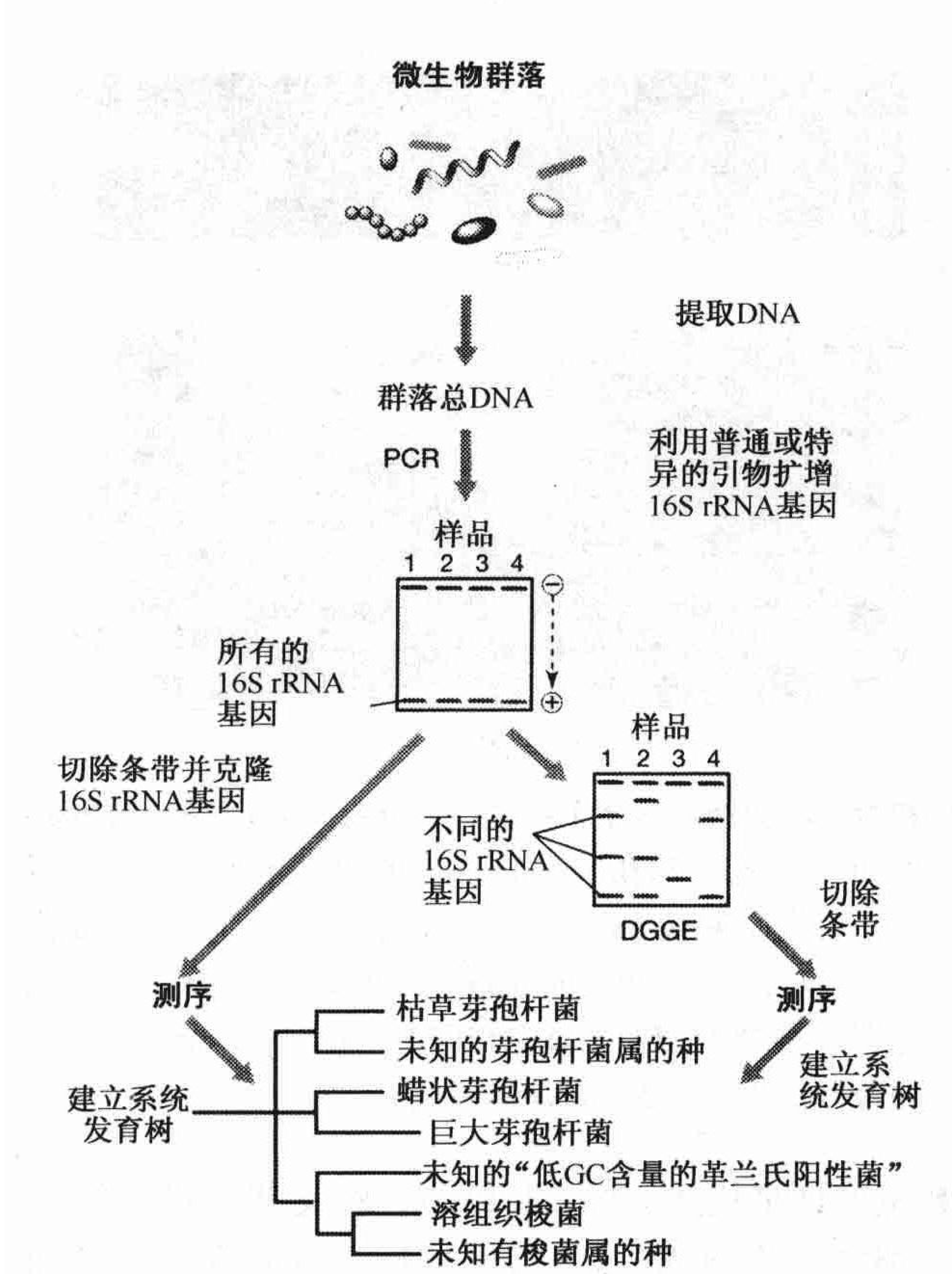


图 18.13　微生物群落中 PCR 启动的生物多样性分析步骤。本实验利用只作用于低 GC 含量的革兰氏阳性菌（见 12.20 节）的引物，从群落总 DNA 中扩增 16S rRNA 基因。将 PCR 的条带切下，通过克隆或 DGGE（图 18.14b）分离不同的 16S 基因。从 DGGE 凝胶中可以看出，样品 1、2、4 具有同样的条带，而样品 2、3 分别具有唯一的条带。通过测序，建立系统发育树。许多序列与以前测出的种不一致，代表"新"种，有待于分离。这样的发现对于分子群落分析是很普遍的，说明自然中存在的许多微生物还未获得纯培养。

的核酸序列却变化多样，导致不同种生物中的目的基因产生进化分歧。因此，如果以测序扩增基因为目的，那与系统进化分析一样，需要在测序前分离不同基因。

分离基因的方法之一是分子克隆（图 18.13，见 10.15 节）。另外一种方法就是变性梯度凝胶电泳（DGGE），这是一种分离大小相同但由于碱基序列不同导致解链（变性）特性不同的基因凝胶电泳方法（图 18.13 和图 18.14b）。DGGE 需要制作 DNA 变性剂梯度，如尿素和甲酰胺的混合物。当双链 DNA 片段通过凝胶电泳到达含有足够变性剂的区域时，双链开始解链，迁移停止（图 18.13 和图 18.14b）。不同的熔化特性很大程度上取决于碱基序列的不同。因此，DGGE 凝胶上不同的带型表示了序列不同甚至是有细微差异的基因。

通过 DGGE，每条带型都能被切下并测序（图 18.13 和图 18.14）。例如，利用 16S rRNA 基因，DGGE 分析提供了一个生境中存在的系统发生型（phylotype）（不同的

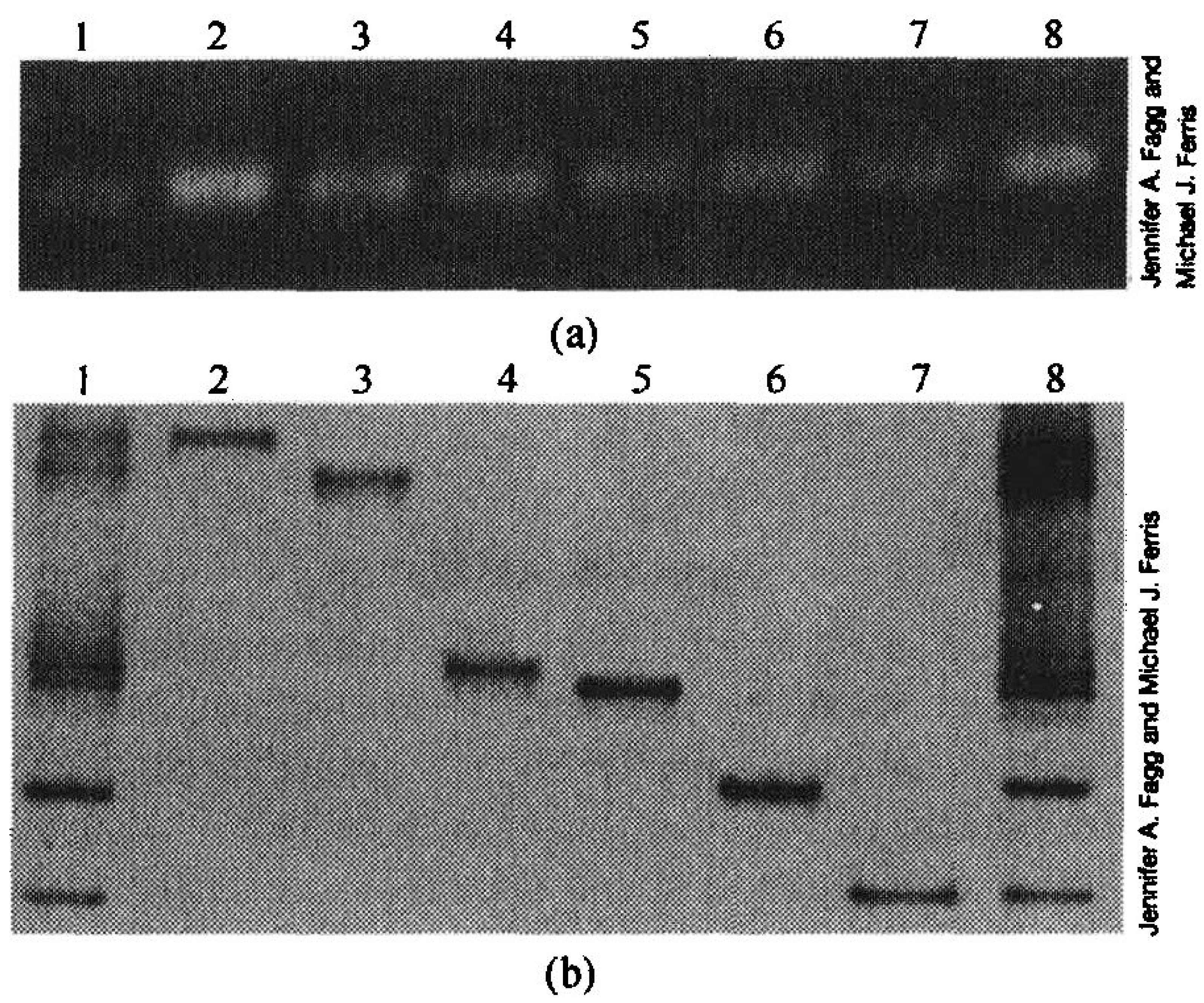


图 18.14 PCR 和 DGGE 分析。从微生物群落中分离大量 DNA，利用引物 PCR 扩增细菌的 16S rRNA 基因（a；孔 1 和孔 8）。PCR 产物只产生单一条带，但这些产物通过 DGGE 分离，实际上含有 6 条不同的 16S rRNA 基因序列（b；孔 1 和孔 8）。纯化这六条带，PCR 扩增（a；孔 2～7），然后进行 DGGE（b；孔 2～7）。这表明了大小相同但序列不同的所有条带，在 PCR 凝胶上具有相同的定位（a），而（b）中孔 2～7 的每条带都能通过测序建立如图 18.13 所示的系统进化树。

16S rRNA 基因）数量的详细描述（图 18.14b）。将这些条带进行测序，在适当数据库中与已知的种属序列比对，能确定在群落中实际存在的种类（图 18.13b）。利用 16S rRNA 以外的其他特殊基因的引物（如代谢基因），DGGE 能提供含有这些特殊基因的系统发生型存在于该群落的情况。在 DGGE 凝胶上得到的条带数量可作为研究在生境中特定基因生物复杂性的线索（图 18.13 和图 18.14b）。

PCR 系统发生分析的结果

微生物群落的系统发生分析已经精确到定性（即“有什么?”）和定量（即“每个种类有多少?”）分析，然而它们有时会出现一些意外结果。以 16S rRNA 作为目的基因，大部分自然微生物群落含有系统发生完全不同的微生物体，它们的核糖体 RNA 序列与实验室培养生物的核糖体 RNA 序列不匹配（图 18.13 和图 18.14）。实际上，许多时候自然群落中绝大部分成员与实验室培养物是很不同的！这些结果清楚地告诉我们从富集培养研究中获得微生物多样性的知识是很不充分的，并且富集偏好（见 18.1 节）似乎是依赖于培养技术的生物多样性研究中一个严重的问题。

概念检查

聚合酶链反应（PCR）能扩增特殊的目的基因，如小亚基核糖体 RNA 基因或关键的代谢基因。变性梯度凝胶电泳（DGGE）用于分离从细微差异到巨大差异的各种基因，这些基因存在于自然样品的不同种属中。

◆ 为什么说引物的特异性是利用 PCR 进行微生物群落分析成功的关键？

◆ 你如何从下面样品中利用 PCR/DGGE 分析得出结论？一个样品中 PCR 和 DGGE 都只得到一条带；或者 PCR 得到一条带，而 DGGE 得到 4 条带。

◆ 利用 16S 核糖体 RNA 作为目的基因，自然生境的许多分子研究能得到什么样意外的结果？

18.6 环境基因组学（宏观基因组学）

一种更加倾向于遗传的微生物群落分子研究方法是环境基因组学（environmental genomics），即宏观基因组学（metagenomics）。在这个方法中，微生物群落中总 DNA 克隆的随机鸟枪法测序（见 15.2 节）用以揭示这个群落的整个基因组（图 18.15）。

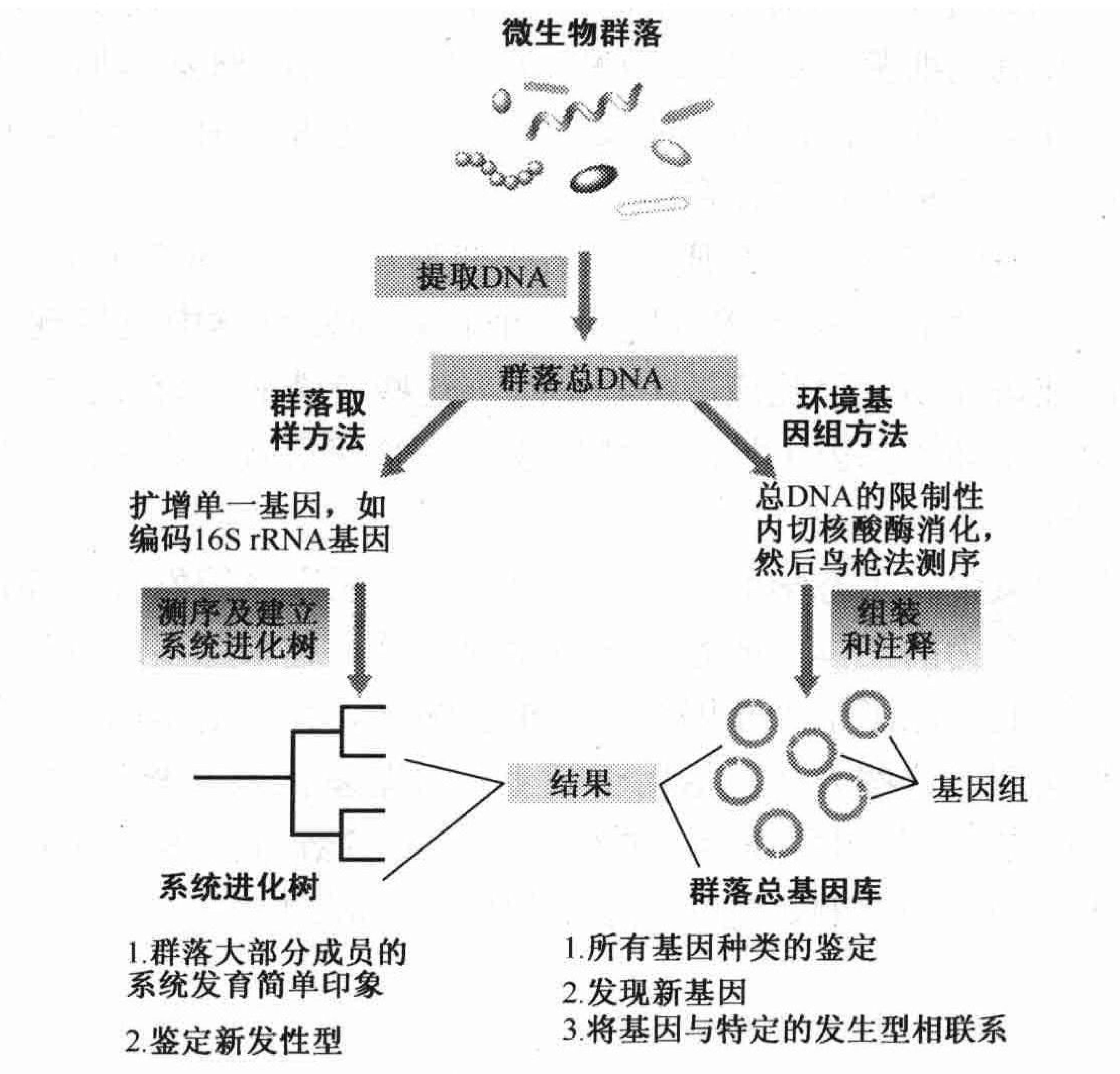


图 18.15　微生物群落分析中单一基因和环境基因组学（宏观基因组学）的比较。 在宏观基因组学方法中，所有的群落 DNA 都能被测序；然而，组装和注释没有显示完整的“完成基因组”，这通常由纯培养物来完成的（见 15.4 节）。因此染色体在组装上会有一些缺口。

环境基因组学的目的并不是像许多微生物的纯培养那样是为了完善和完成基因组序列（第 15 章），相反，它的目的是为了检测尽可能多的编码已知蛋白质的基因，并将它们归类于不同的系统发生“骨架”上。通过测序基因的重叠部分可以实现，这些基因包括系统发生标记［如 16S rRNA 基因（图 18.15）］，区别于之前章节讨论的群落分子分析中的环境基因组。之前章节的重点在于单一基因的生物多样性；相反，在环境基因组学中，取样于微生物群落的所有基因——宏观基因组（metagenome），使群落基因图谱

更加生动。

尽管与单一基因分析相比，该法规模更大花费更多，但这个方法本身更具有深度，而且，宏观基因组能揭示微生物群落的特征，这是单一基因方法无法做到的。例如，在Sargasso海洋原核生物的后基因组研究中，巨大多样性是以前进行rRNA群落研究所没有发现的。这是因为在PCR分析中，并不是所有的16S rRNA基因都能通过通用引物或特殊区域的引物得到扩增，这些没有得到扩增的基因自然无法检测到。由于直接利用鸟枪法测序群落DNA而不需要先进行PCR扩增，环境基因组学可避免以上问题（图18.15）。因此，无论能不能被扩增到，所有的基因都能进行测序。

环境基因组学的潜力

环境基因组学能在已知生物中发现新基因，也能在新生物中发现已知基因。例如，在对Sargasso海洋的研究中，有时在未知系统发育群的基因组中发现编码特殊代谢的基因。例如，编码氨氧化细菌（见12.3节和17.12节）关键酶氨单加氧酶的基因就是在古生菌的基因组骨架上发现的。虽然还没有关于氨氧化古生菌的描述，但是环境基因组学已经告诉我们它们几乎是肯定存在的。

第二个例子是，编码变形菌视紫质——某些变形菌纲中的光调控质子泵（见13.1节）的基因在Sargasso海洋原核生物生境的几个新系统发育群中被发现。由于还没有获得这些微生物的纯培养物，因此该微生物形态与这些特殊的系统发育之间的联系受到怀疑。这些例子说明了环境基因组如何为微生物生态学探索微生物多样性提供了其他方法所不能达到的新途径。

环境基因组学为微生物生态学的两个主要目标——研究系统发育多样性和微生物群落代谢多样性提供了有力的工具。随着测序费用的降低，越来越多的微生物群落分析倾向于基因组方法。然而，除了整个基因组的鸟枪法测序，其他更多以环境基因组学为目标的方法将可能被实现。这些方法包括用于微生物群落基因表达检测的微阵列法（microarray）（见15.11节）。利用微阵列法能检测出环境参数对群落、特定群体或整个微生物群落中单个成分转录的影响，这取决于如何构建微阵列。

概念检查

环境基因组学包括对微生物群落中存在的生物群体的基因组进行鸟枪法测序和分析。

◆ 什么是宏观基因组？

◆ 环境基因组学方法与微生物群落分析，如基于16S rRNA基因的分析有何不同之处？

Ⅲ 自然界中微生物活性测定方法

至今为止本章所讨论的重点是生物多样性，现在我们将转向微生物活性（microbial activity）的测定方法，包括①放射性同位素；②微电极；③稳定性同位素。

自然样品活性测定方法是对整个微生物群落的集中估计，虽然 FISH-MAR 技术允许对一个以上目的群落的活性测定，然而好的活性测定方法应该可以揭示生境中主要代谢反应的类型和速率，这些参数与生物多样性评估一起定义该生境的微生物生态学，它们同样能为富集培养的设计提供有价值的信息。

18.7 放射性同位素和微电极

在许多情况下，对微生物转化进行直接化学测量对于环境中微生物活性的评估已经足够。例如，很容易在沉积物样品中检测到硫酸盐还原菌的乳酸盐氧化反应，乳酸盐被消耗并且 SO_4^{2-} 还原为 H_2S（图 18.16a）。这些物质容易进行化学测量。然而，当灵敏度要求较高，如确定转化率或示踪一个分子的质子动向时，放射性同位素（radioisotopes）是非常有用的。例如，如果要测定光能自养型细菌，可以测定微生物细胞对 $^{14}CO_2$ 的光依赖吸收（图 18.16b）。如果对硫酸盐还原作用感兴趣，可以测定 $^{35}SO_4^{2-} \rightarrow H_2^{35}S$ 的转化率（图 18.16c）。还可以通过示踪含 ^{14}C 标记的有机化合物中释放的 $^{14}CO_2$，检测化能有机营养作用（图 18.16d）等。

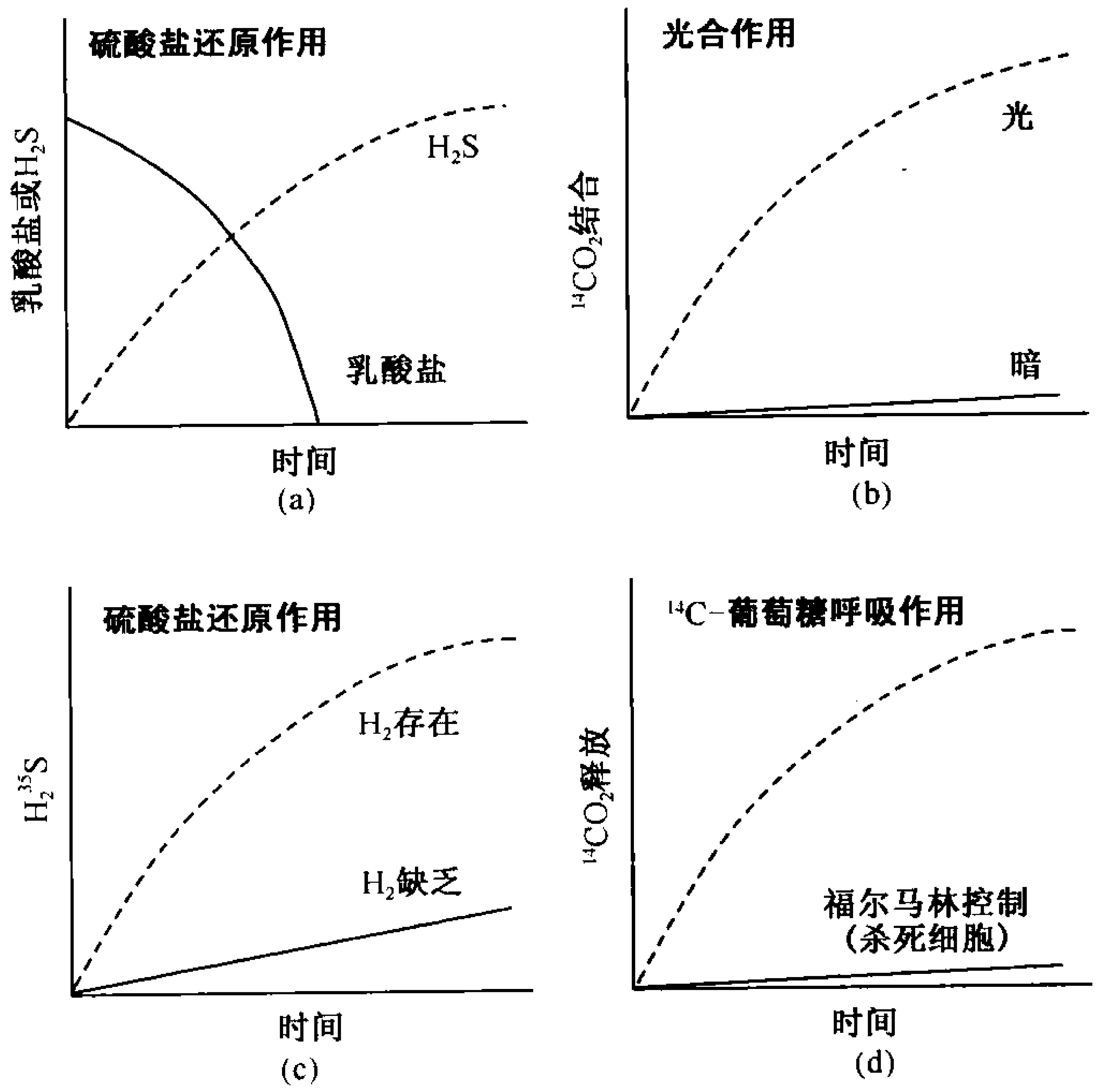


图 18.16　微生物活性的测定方法。（a）硫酸盐还原作用中乳酸盐和 H_2S 的化学测定。（b～d）使用放射性同位素。（b）利用 $^{14}CO_2$ 检测自然界中海水的光合作用。（c）利用 $^{35}SO_4^{2-}$ 检测污泥中的硫酸盐还原作用。（d）从 ^{14}C-葡萄糖中产生的 $^{14}CO_2$。

同位素方法广泛应用于微生物生态学。然而这些方法必须加以适当的控制，因为所标记化合物的某些转化可能是一个严格的化学过程（而不是一个微生物过程）。关键是对细胞致死量的控制。必须了解的是，转化作用可被微生物作用阻遏或被杀死微生物的

化学试剂或热处理等方法所阻止。在研究微生物生态学时，通常用终浓度为4%的福尔马林作为化学杀菌剂，这个浓度的福尔马林能杀死所有的细胞，当它存在时，放射性物质发生转化是由于非生命过程（图18.16d）。

结合FISH的放射性同位素：FISH-MAR

放射性同位素在显微技术中用于微生物活性测定的方法称为显微放射自显影（microautoradiography，MAR）。在这个方法中，来自纯培养或微生物群落的细胞使用一种放射性同位素，如化能有机营养中的有机化合物或用于自养生物的CO_2。曝光之后，细胞黏附在载玻片上，将载玻片浸入照相用的感光乳剂中。黑暗中放置一段时间，在感光乳剂中，合并的感光底层放射衰变曝光成银色颗粒。这些颗粒在细胞周围以黑点形式出现（图18.17a）。

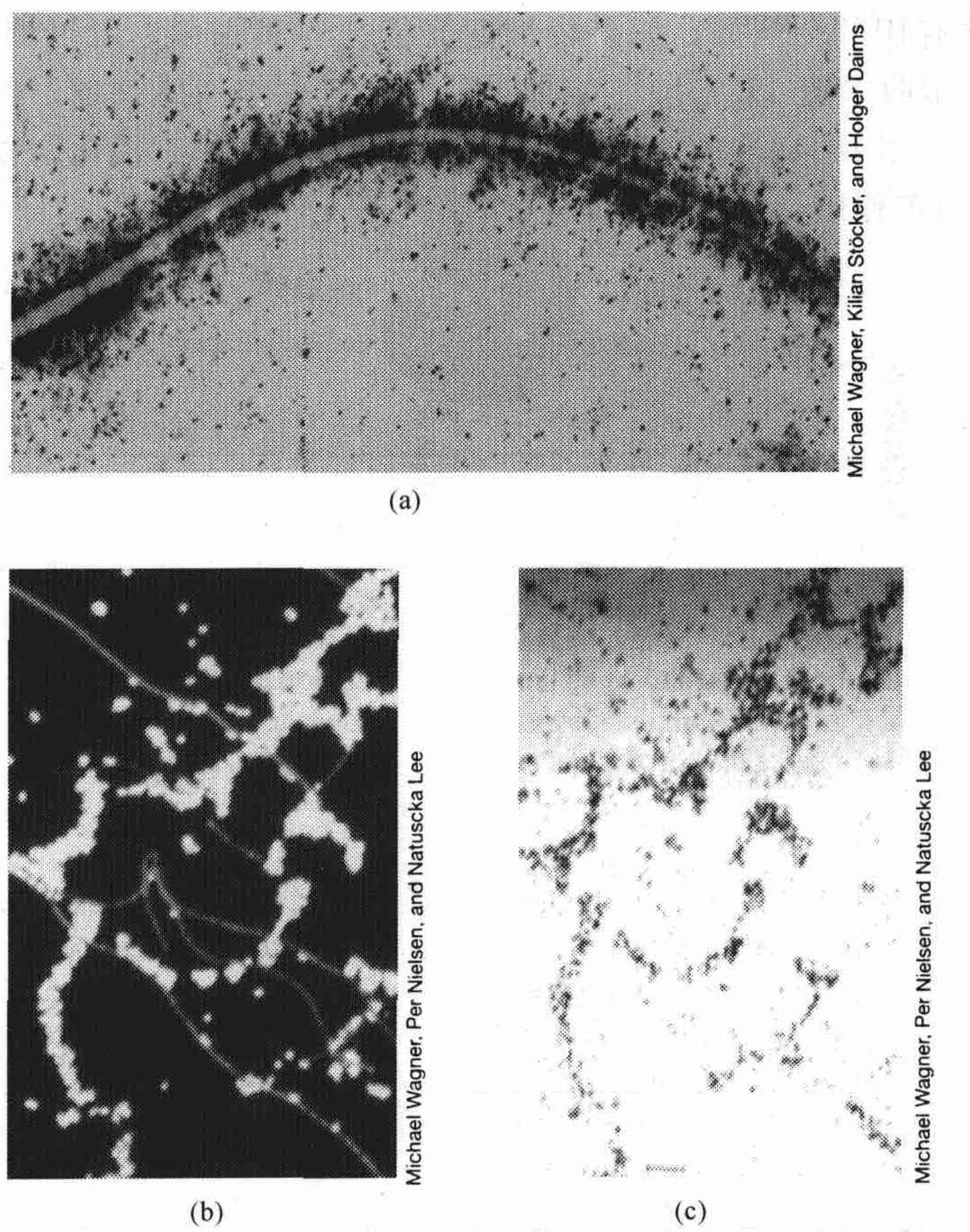


图18.17 FISH-MAR。环境荧光原位杂交结合显微放射自显影（MAR）。（a）一个属于γ-变形杆菌纲的非培养纤维细胞（通过FISH分析），同时也是自养生物（通过MAR测定$^{14}CO_2$的吸收）。放射衰变在照相感光乳剂中曝光，产生黑点。（b）大肠杆菌（*Escherichia coli*）（黄细胞）和橙色滑柱菌（*Herpetosiphon aurantiacus*）（纤维状，绿细胞）混合培养中的^{14}C-葡萄糖的吸收。（c）与（b）相同部位的MAR显示。薄膜合并的放射性曝光，显示大肠杆菌细胞吸收葡萄糖，而橙色滑柱菌的细丝不吸收葡萄糖。

MAR 还可以与 FISH（见 18.4 节）结合为 FISH-MAR，成为结合了鉴定和活性测定的有力工具。FISH-MAR 可以同时鉴定出自然样品中哪种微生物代谢了特定放射性底物（通过 MAR），以及鉴定微生物的代谢过程（通过 FISH）（图 18.17b）。因此 FISH-MAR 超越了简单的鉴定，跨出了重要一步。这个技术同样能获得群落中有价值的生理学信息，这些信息不仅有助于我们对微生物生态系统活性的理解，还有助于指导富集培养。例如，哪种生物代谢哪种底物的信息可以用于制定特殊的富集方法。

微电极

微生物生态学家用小的玻璃电极，即微电极（microelectrode）来研究自然界中的微生物活性。最常用的微电极为测定 pH、氧、N_2O、CO_2、H_2或 H_2S 的电极。正如其名，微电极非常小，电极顶端的直径范围为 2～100μm（图 18.18a）。电极必须以 1mm 或更小的增量小心地插入生境中，以便在微环境水平上检测微生物的活性（图 18.18b）。

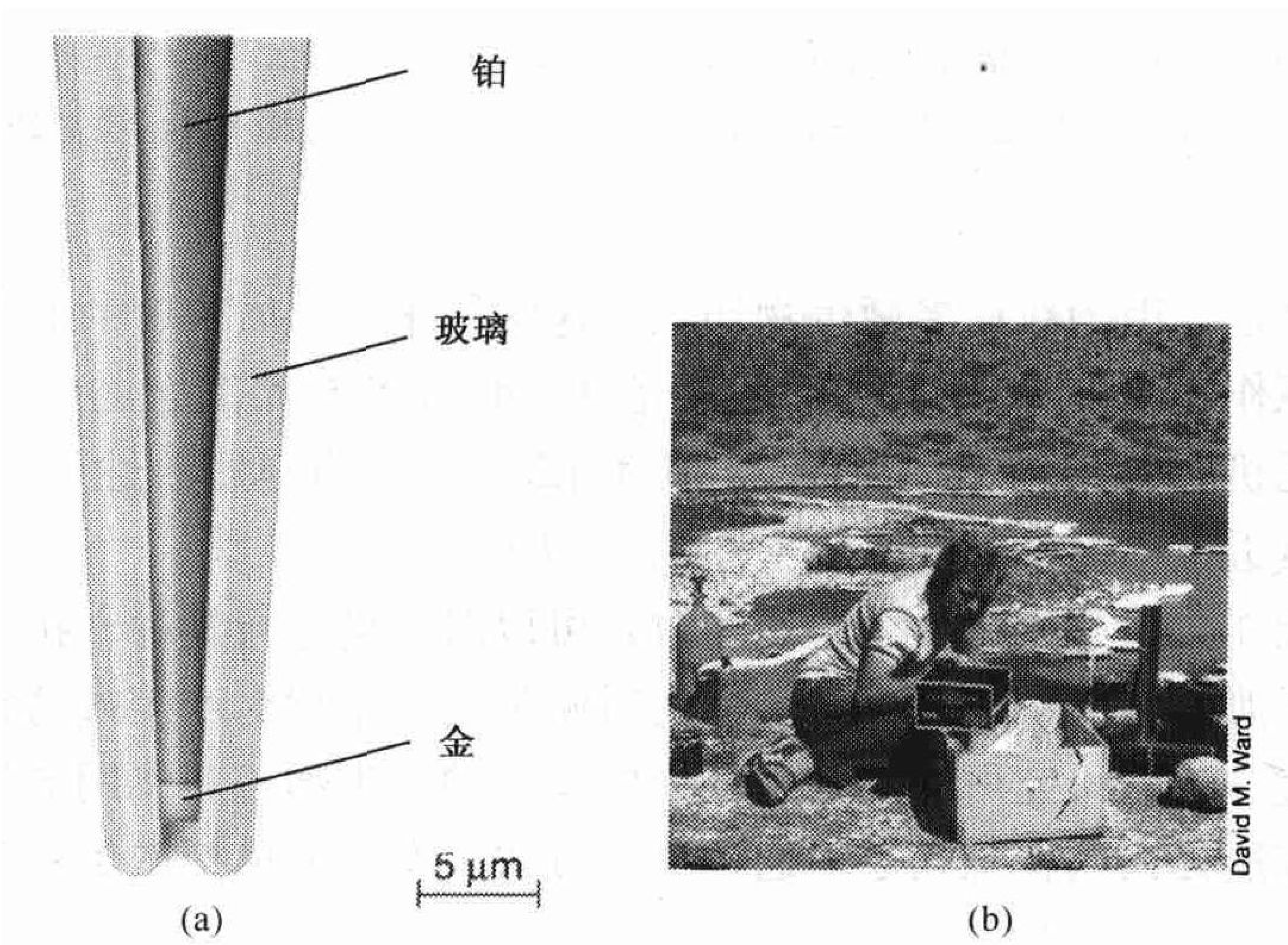


图 18.18　微电极。（a）一个氧电极的示意图。铂杆为阴极，当加电压时，O_2还原为 H_2O，产生电流。阴极的金表面上 O_2 还原产生的电流与样品中氧浓度成正比。注意电极的尺寸。（b）微电极应用于微生物膜的照片（图 18.19a）。

微电极已经广泛应用于微生物活性的研究，包括微生物膜的光合作用。微生物膜（microbial mat）是微生物群落形成的一个层面，通常蓝细菌在最上层，不产氧光合营养菌在下一层（直到透射到菌膜的光很有限），化能有机营养菌特别是硫酸盐还原菌在最下层（图 18.18b 和图 18.19）。微生物膜能在各种环境中被发现，特别是在温泉（图 18.19）和海水潮间带区域。

使用氧微电极可以灵敏地测定微生物膜（图 18.19b）或土壤颗粒（图 19.2）中相当细小间隔的氧气浓度。运用显微操作器可以把电极插入样品中，通过一段 0.05～0.1mm 的距离来读取数据（图 18.18b 和图 18.19b）。微电极库对不同化学转化有不同的灵敏度，它可以在同一时间内对许多微生物的转化进行测定。例如，通常将氧气和硫

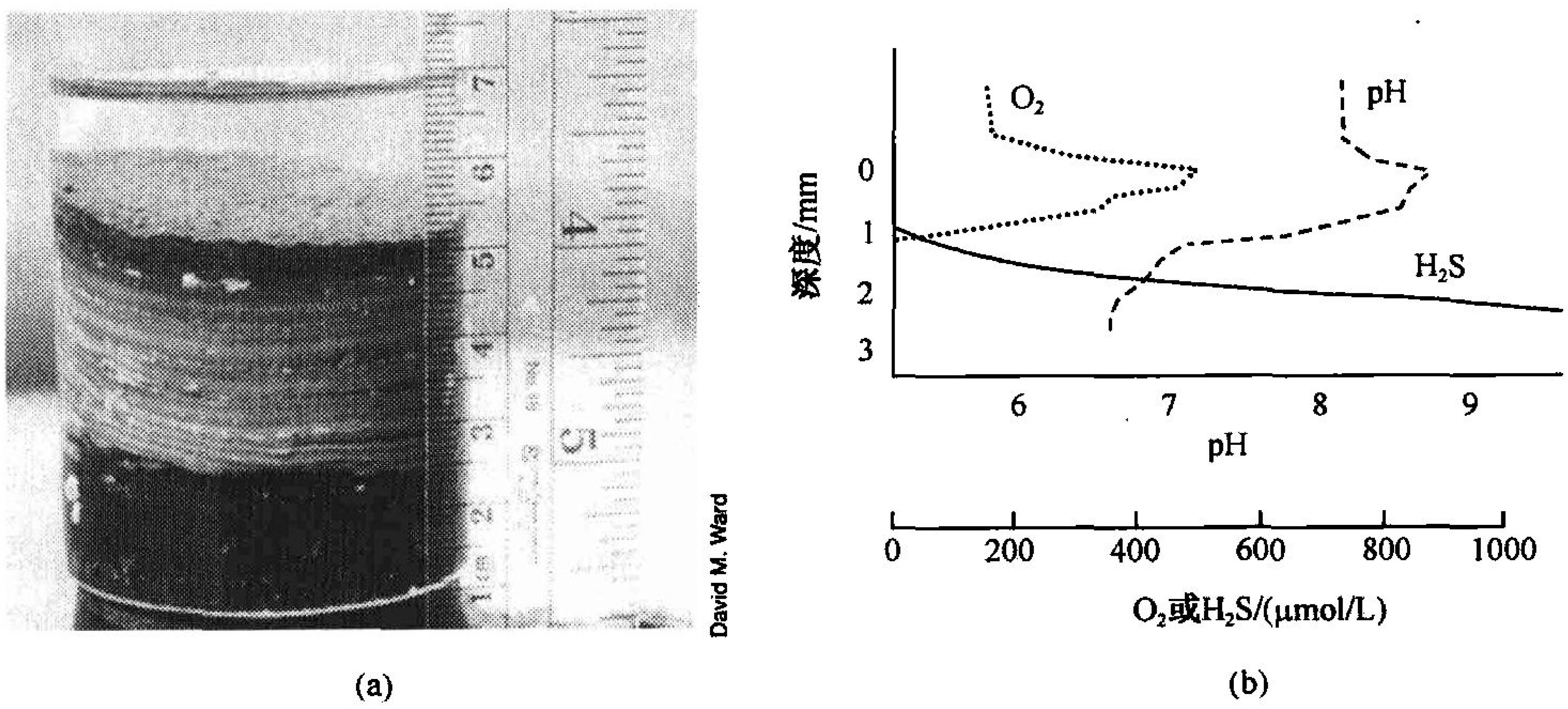


图 18.19 微生物醭和用微电极来研究微生物醭。(a) 是在 (b) 的实验中所用的一种温泉微生物醭的核心照片。上层（深绿色）含有蓝细菌（见 12.25 节），下面是几层不产氧的光合营养菌（橙色），主要是绿屈挠菌属（*Chloroflexus*）（见 12.35 节）。微生物醭的整个厚度约为 2cm。(b) 一个温泉微生物醭小剖面中氧气、硫化物和 pH，注意纵坐标尺寸为毫米。

化物一起进行测定，因为在许多微生物环境中这两种化学物质梯度的形成分别是光合作用和硫酸盐还原作用的结果（图 18.18b）。在 O_2 和 H_2S 开始混合的区域附近，光合营养细菌和化能无机营养硫细菌（见 12.2 节和 12.4 节）的剧烈活性可能消耗这两种底物，使其浓度接近微电极检测的极限（图 18.19b）。

使用微电极作为检测工具插入生境同时，可以对生境进行某种干扰。例如，引入一种有机化合物或遮住微生物醭的表面，以实时测量这些干扰对产生或消耗某种特殊化合物的影响。通过这样的研究可以推论出环境中发生的微生物相互作用的类型。同样可以通过试验，研究所提出的特殊问题。通过这个方法，有可能模拟微生物环境的原位代谢过程。

概念检查

自然界中样品的微生物活性可以用放射性同位素或微电极非常灵敏地测定出来。在很多情况下，这些方法更适用于测定一个微生物群落的净活性，而非单一物种的群落活性。

◆ 为什么放射性同位素在测定微生物活性时非常有用?

◆ MAR 缩写代表的意思以及如何检测 MAR 反应?

◆ 解释微电极如何工作。

18.8 稳定性同位素

大多数元素都存在不同的同位素，含有不同数量的中子，有些同位素是不稳定的，

且由于放射性衰变而衰减；而另外一些称作稳定性同位素（stable isotope）不具有放射性，但在微生物中的代谢方式上有所不同，因此它们可用于研究自然界中各种微生物的转化（图 18.20）。

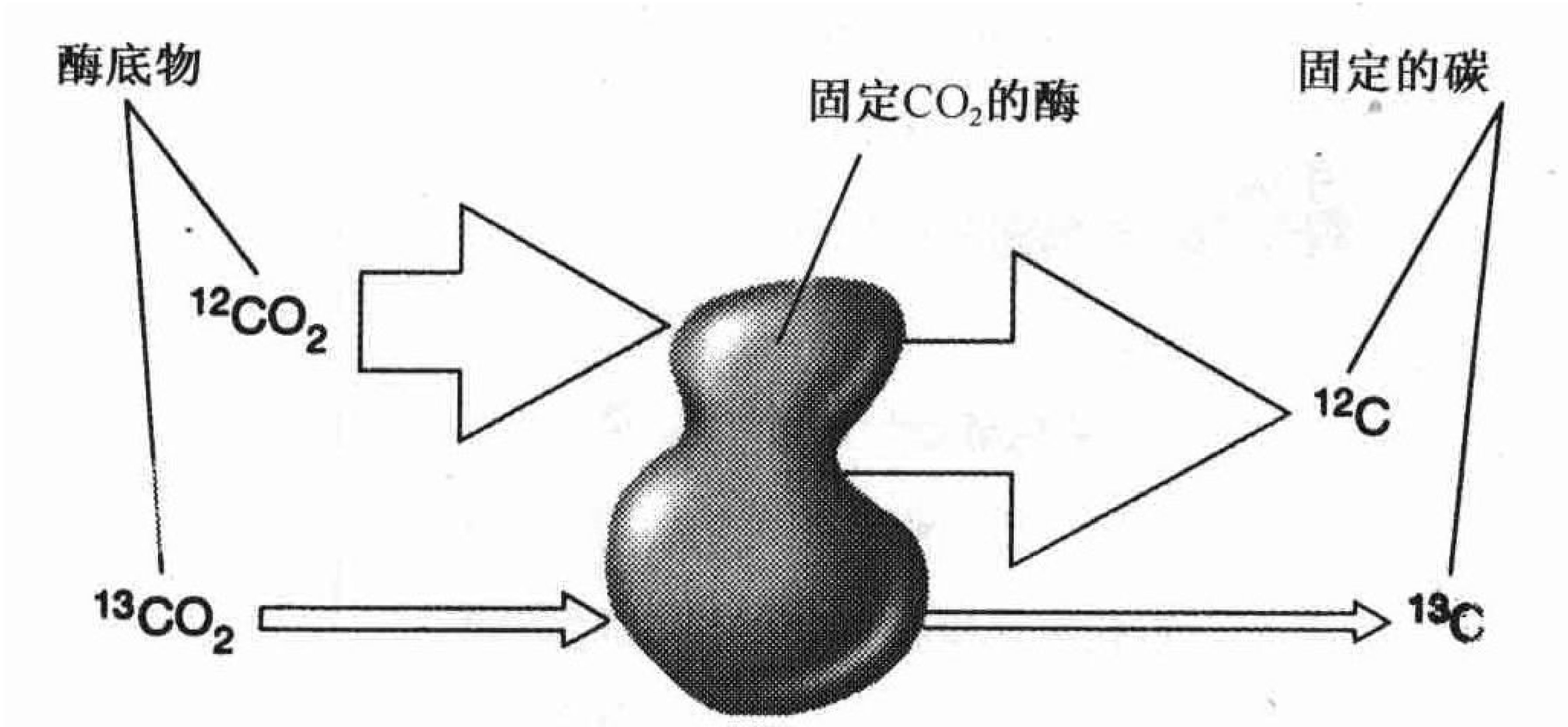


图 18.20　以碳为例阐明同位素分部分离的机制。尽管$^{12}CO_2$与$^{13}CO_2$自然丰度的比率为 19 : 1，但固定 CO_2的酶优先固定轻同位素（^{12}C），这就导致了^{12}C比^{13}C被优先固定。所以当同位素分部分离时^{13}C排除的程度可以计算（见图 18.21 对计算的图例解释）。箭头大小表明了与碳不同的同位素相对丰度。

有两种化学元素已被证明在稳定性同位素研究微生物生态学中是最有用的，它们是碳和硫，特别是 CO_2、SO_4^{2-}和 H_2S。碳在自然界中主要以^{12}C形式存在，而少量碳（大约 5%）以^{13}C形式存在；同样硫主要以^{32}S形式存在，也有些硫以^{34}S形式存在。因为生物化学反应倾向于较轻的同位素，所以当碳和硫被微生物代谢时，这些存在于给定化合物中同位素的天然含量会发生变化，也就是说，当化合物被酶代谢时，相对于轻同位素的重同位素可以被辨别出来（图 18.20）。例如，当用 CO_2培养光合营养微生物时，相对于碳标准来说，细胞中的碳变成富含^{12}C而排除^{13}C，同样，细菌的硫酸盐还原作用产生的硫化物要比天然化学形成的那些轻，这种现象称为同位素分部分离（isotopic fractionation）（图 18.20），它不是特有的生物现象，因此可用于生物学或非生物学特殊转化的分析手段。

同位素分部分离在微生物生态学中的应用

一个样品的同位素成分包含了它过去生物活性的记录。以碳为例（图 18.21），植物与石油（由植物衍生的）有相似的同位素成分，这两种来源的碳在同位素上要比非生物学的标准轻，这是因为它经过一个排除$^{13}CO_2$的途径而被固定（图 18.21）。另外，微生物来源的甲烷非常轻，说明产甲烷古生菌（见 13.4 节）可以通过这个重要途径将^{13}C辨别出来。相反，海洋碳酸盐能清楚地反映地质起源，由于生物和地质起源中碳的^{12}C和^{13}C比率不同，因此地质层的$^{13}C/^{12}C$同位素比率通常用作鉴定古岩石中所含生物的起源。有趣的是，在 3.5 亿年的岩石中的有机碳出现了一些同位素的分部分离（图 18.21），说明在那个时候生命就已经存在了。

自然界中硫酸盐还原细菌的活性很容易通过对$^{34}S/^{32}S$的分部分离得知（图 18.22）。与硫化物标准比较，沉积物硫化物富含^{32}S，而非生物起源的硫化物（如火山沉淀形成的火焰石）就富含硫的重同位素（图 18.22）。同位素分部分离可以监测硫循环中的重

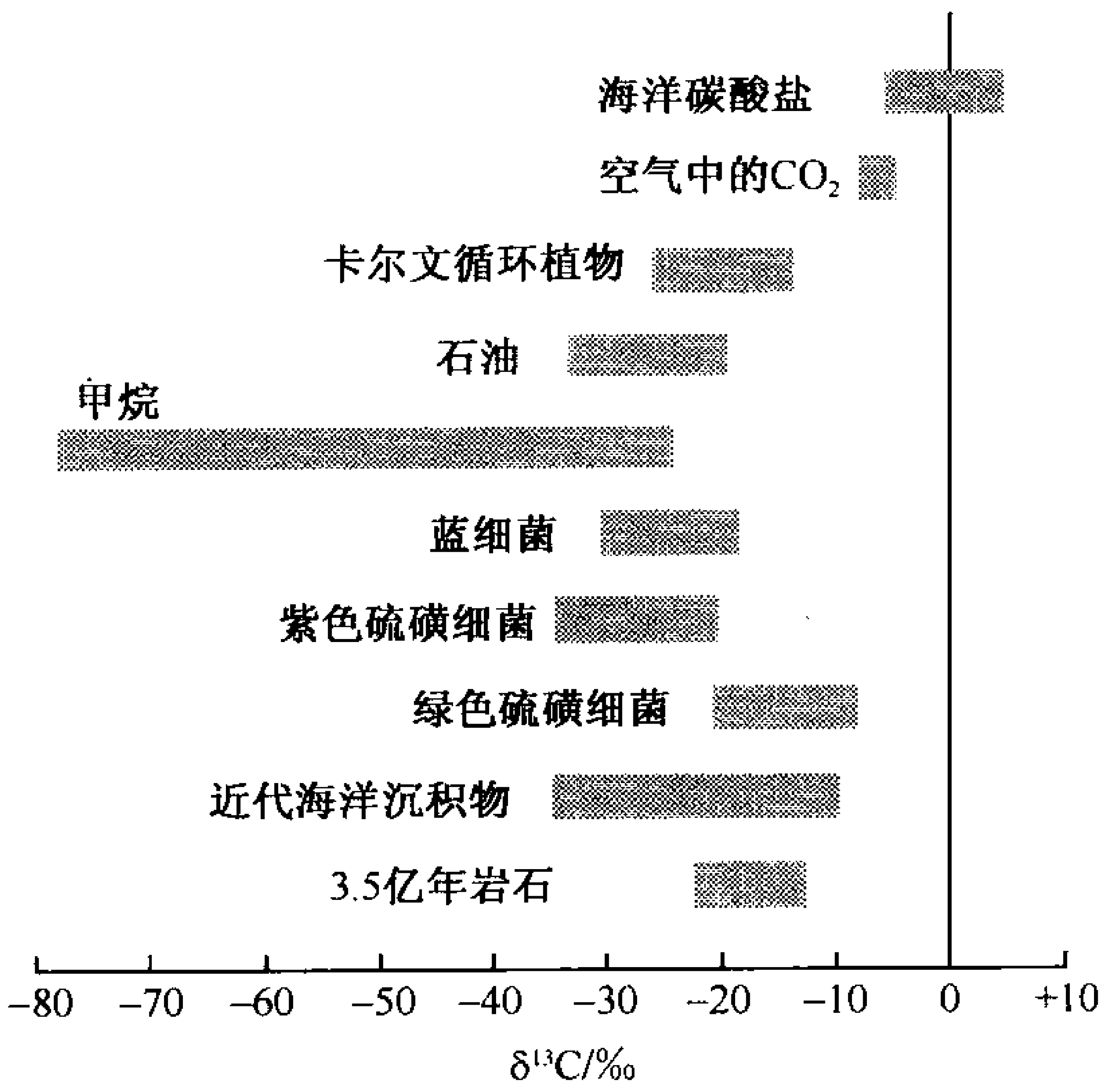


图 18.21 不同基质的碳同位素成分。该值以每千分之一（‰）为单位，有下列公式计算：$\frac{(^{13}C/^{12}C\text{样品})-(^{13}C/^{12}C\text{标准})}{(^{13}C/^{12}C\text{标准})}\times 1000$，标准是 PeeDee 岩石样品。注意自养生物中碳的固定是趋向于富含^{12}C形式而排除^{13}C形式。

要环节，它已经被广泛应用于示踪地质层中参与硫循环原核生物的活性。硫同位素分析还可作为月球上缺乏生命体的证明。例如，图 18.22 的数据显示，月球岩石硫化物同位素成分非常接近硫化物标准，而不同于生物起源的硫化物。

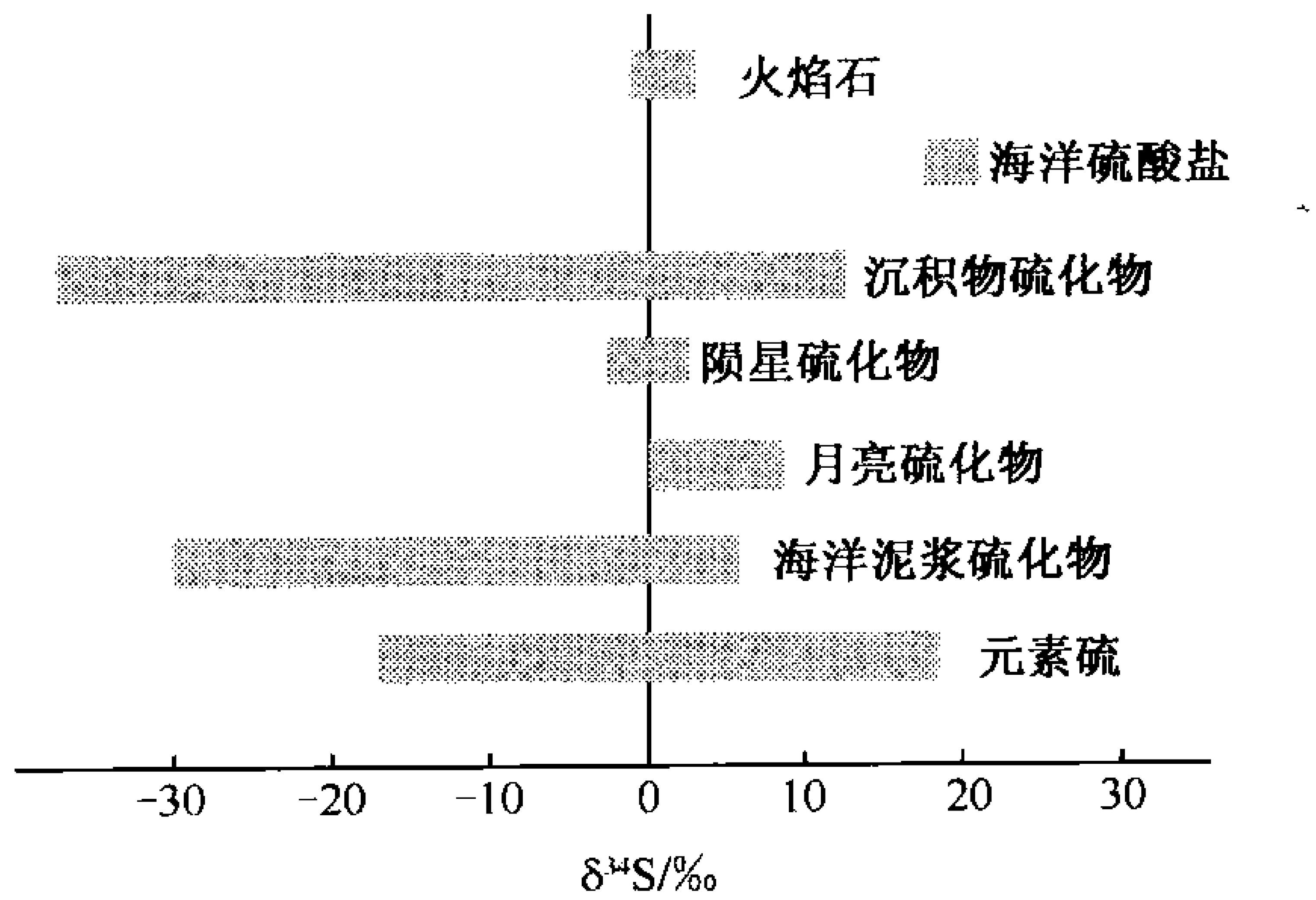


图 18.22 硫的同位素地球化学的概括，显示了不同含硫基质^{34}S和^{32}S值的范围。该值以每千分之一（‰）为单位，有下列公式计算：$\frac{(^{34}S/^{32}S\text{样品})-(^{34}S/^{32}S\text{标准})}{(^{34}S/^{32}S\text{标准})}\times 1000$，标准是 CanyonDiablo 陨星的硫化铁矿石。注意生物起源的硫化物和硫趋向于排除^{34}S形式（富含^{32}S形式）。

氧同位素分析（$^{18}O/^{16}O$）已用于示踪地球从一个无氧环境到有氧环境的转化过程，而地球的氧分子起源于蓝细菌的有氧光合作用（见 11.1 节）。利用这个工具已经可以说明地球是被逐步氧化的并且现在的氧水平已经存在了至少 75 亿年（见 11.3 节和图 11.8）。

结语

通过本章了解了微生物生态学家所使用的一些技术，我们将进入第 19 章探索微生物生态学本身的规律，在这一章思考自然界中微生物群落的组成以及它们的主要活性，在多数情况下，我们会使用本章提到的一种或几种工具来帮助我们在高度分化的微生物群落中阐明重要原理和鉴定最活跃的微生物种类。

概念检查

同位素分部分离可以揭示不同物质生物起源的信息。分部分离是酶作用的结果，酶能将结合在底物中元素的较重同位素辨别出来。

◆ 一个底物的$^{12}C/^{13}C$成分如何告诉我们它可能的生物起源？

◆ 用同位素原理简要地概述为什么月球的硫化物重？

复习题

1. 富集培养技术的基础是什么？为什么一种富集培养基通常只适合富集某一种或某一种群的细菌？（见 18.1 节）
2. Winogradsky 柱的原理是什么？什么类型的生物适用于富集？Winogradsky 柱如何富集极端环境中的生物，如温泉微生物醭？（见 18.1 节）
3. 请描述用于计算自然样品中细菌数目的 MPN 原理。（见 18.2 节）
4. 为什么激光镊子比稀释法和液体富集法在获得样品中低含量微生物方面更先进？（见 18.2 节）
5. 应用荧光染料和荧光抗体方法来计算自然环境中的细菌，试比较和对比两种方法的优点和局限性是什么？（见 18.3 节）
6. 在微生物生态学中，核酸探针与培养方法一样灵敏吗？核酸方法比培养方法有什么优点？什么缺点？（见 18.4 节）
7. 染色体彩绘如何操作？为什么它是用于计数一些具有特殊代谢过程生境中微生物的好方法？（见 18.4 节）
8. 什么是绿色荧光蛋白？绿色荧光蛋白与细胞染色例如系统发育染色在哪些方面不同？（见 18.4 节）
9. 如何不通过培养菌体而获得微生物群落的系统发育图？（见 18.5 节）
10. 群落总 DNA 利用特殊引物进行 PCR 扩增后，为什么通常需要在测序前进行克隆或将 PCR 产物进行 DGGE 分离？（见 18.5 节）
11. 举例说明环境基因组是如何从一个新的生物中发现已知代谢的？（见 18.6 节）
12. 在研究微生物生态学中，放射性同位素方法的主要优点是什么？在一个放射性同位素实验中，什么控制类型（至少讨论两种）显示光合营养细菌$^{14}CO_2$结合作用或硫酸盐还原细菌$^{35}SO_4^{2-}$还原作用？（见 18.7 节）

13. FISH-MAR 能做到而单一 FISH 做不到的是什么？（见 18.7 节）
14. 与提供的 CO_2 相比较，自养生物含有的 ^{12}C 是更多还是更少？（见 18.8 节）

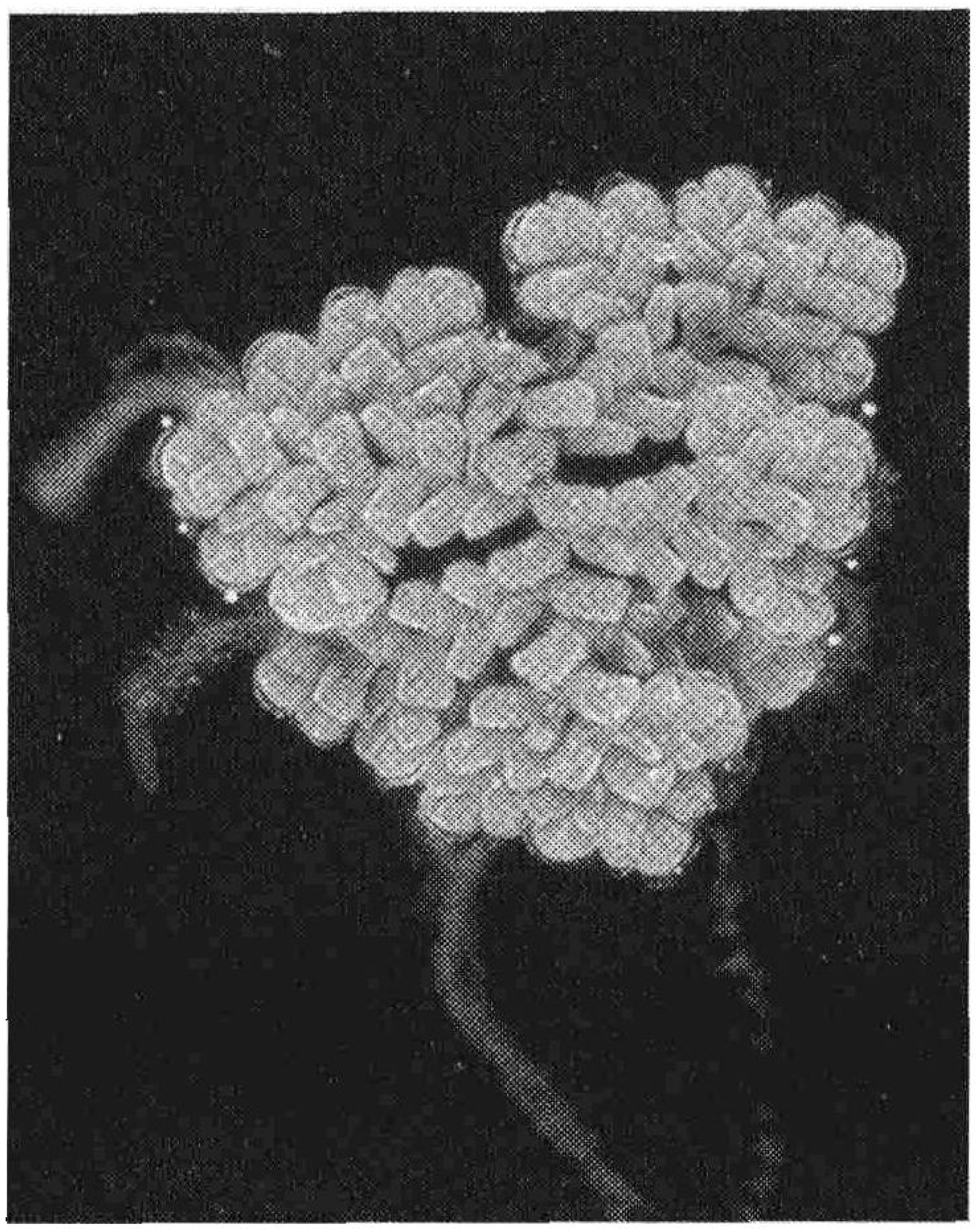
应用题

1. 如表 18.1 所述，为什么要富集硝化细菌？为什么每种营养源和条件都是必需的？（你可以在回答前复习 12.3 节和 17.2 节的内容）
2. 设计一个用于测定土壤中硫氧化细菌活性的实验。如果存在的硫磺氧化细菌只有一部分种类具有代谢活动，你如何进行描述？如何证明活性测定是根据生物活性来进行的？
3. 你希望知道湖水样品中是否存在古生菌（*Archaea*），但是又无法成功培养出目的菌。利用本章所述的技术，你如何鉴定古生菌是否存在于样品中？如果它们存在，那么存在于湖水中的具有什么样细胞特征的菌株才是古生菌？
4. 你希望在不同土壤样品中鉴定是否存在能利用卡尔文循环自养生长的微生物（见 17.6 节）。这个途径需要独特的酶即核酮糖二磷酸羧化酶（RubisCO）。描述你能做到的两种方法，一种利用显微方法，另一种方法既不需要培养又不需要显微技术。
5. 设计一个实验解决以下问题。检测在无氧湖水沉积物中甲烷生成（$CO_2+4H_2 \rightarrow CH_4+H_2O$）的速率，是否为 H_2 限制型。同样，检测优势产甲烷微生物的形态（复习古生菌，见 13.4 节）。最后，计算在沉积物中优势产烷菌在总古生菌和总原核生物群落中所占的百分比。

（宋存江　译，马　挺　校）

19

微生物生态学



自然界中微生物与其他微生物、植物和动物相互作用。这里我们所看到的是水中蕨类植物满江红（*Azolla*）和鱼腥藻属（*Anabaena*）的固氮共生蓝细菌的有益联合体，细胞生活在植物叶子的孔穴中。

词汇表

酸性矿排出水（acid mine drainage）：微生物氧化硫铁矿产生的含有 H_2SO_4 的酸性水

无氧的（anoxic）：指缺乏氧的环境，通常也是高度还原的环境（低的 E_0'）

类菌体（bacteroid）：指在豆科植物根瘤中形态上畸形的根瘤菌细胞，能够固氮

嗜压的（barophilic）：指生物体在压力大于 1atm（$1atm=1.01325\times10^5Pa$）下也能生长很好

耐压性（barotolerant）：指生物体在提高压力下也可以生长，但在大气压下生长得最好

生化需氧量（biochemical oxygen demand，BOD）：水样本微生物耗氧特性

生物膜（biofilm）：带有多孔黏液物质并且附着于一个表面上的微生物细胞菌落

生物地球化学（biogeochemistry）：研究以生物为媒介的化学转化

生物整治（bioremediation）：通过微生物清除油、有毒化学物质和其他污染

黑烟（black smoker）：指极端热（250～350℃）的深海温泉喷发出的热水和各种矿物质的混合物

共代谢（cometabolism）：系指在有一种化合物存在的情况下，还有第二种有机化合物的代谢，它可以作为初级能量来源

反硝化作用（denitrification）：NO_3^- 还原成气态氮化合物的微生物过程

生态系统（ecosystem）：指生物体与它们的自然环境形成的群落

共位群（guild）：代谢相关的微生物群体

热水流火山口（hydrothermal vent）：深海中的各种温泉

侵染线（infection thread）：在根瘤形成过程中，根瘤菌属细胞通过纤维素管可以达到并侵染根细胞

豆血红蛋白（leghemoglobin）：根瘤中与氧结合的蛋白质

地衣（lichen）：真菌和藻类（或蓝细菌）的共生体

微生物浸矿（microbial leaching）：通过微生物活动提炼有价值的金属，如从硫化矿中获取铜

微环境（microenvironment）：微生物细胞或细胞群周围的环境

菌根（mycorrhizae）：真菌与植物根之间的一种稳定的共生联合体

硝化作用（nitrification）：NH_3 氧化成 NO_3^- 的过程

固氮作用（nitrogen fixation）：微生物将 N_2 还原成 NH_3

有氧的（oxic）：有氧的环境通常具有高电势（E_0'）

初级生产者（primary producer）：利用光将 CO_2 合成新的有机物的生物体

变形菌视紫质（proteorhodopsin）：存在于某些开放海洋细菌中的光敏感蛋白，可催化 ATP 形成

黄铁矿（pyrite）：普通含铁的矿，铁的存在形式为 FeS_2

还原脱氯作用（reductive dechlorination）：从一个有机化合物中通过还原碳原子从 C—Cl 到 C—H 来使 Cl 成为 Cl^-

根际（rhizosphere）：与植物根邻近的区域

根瘤（root nodule）：生长在植物根部的肿瘤状突起，含有内共生固氮菌

瘤胃（rumen）：反刍动物多个分隔室胃的第一个分隔室，在此进行纤维素分解

互养共栖（syntrophy）：需由两种或两种以上微生物合作完成的一种代谢过程，其中任何单独一种都不能完成

Ti 质粒（Ti plasmid）：存在于根癌农杆菌中的一种接合质粒，它可以把基因转移到植物中

挥发性脂肪酸（volatile fatty acid，VFA）：瘤胃发酵时产生的主要脂肪酸（乙酸、丙酸和丁酸）

异生素（xenobiotic）：一种完全合成的而不是自然界存在的物质

微生物在自然界并不孤单，生态系统中的每种微生物与它的周围环境和其他生物相互作用，这些相互作用可以导致环境明显的化学和物理变化，对其他生物也许是有益的，也许是有害的。无论是有害的、有益的，还是中性的，微生物共同的作用在很大程度上控制着生物圈的活动。

本章我们将讨论主要的微生物活动，首先用一般方式看一下微生物生态系统，然后探查一些微生物的不同环境——土壤、淡水和海洋，接下来我们讨论一些微生物生态系统中的主要反应，集中在有助于维持地球上植物生命的营养循环，最后讨论一些微生物与植物和动物的特殊关系。

Ⅰ 微生物生态系统

19.1 种群、共位群和群落

自然界中，单个微生物细胞生长形成种群（population）。代谢上相关的种群称为共位群（guild），各种共位群在微生物群落（microbial community）中相互作用（图 19.1）。反过来，微生物群落与大型生物体群落和环境相互作用定义为完整生态系统（ecosystem）。

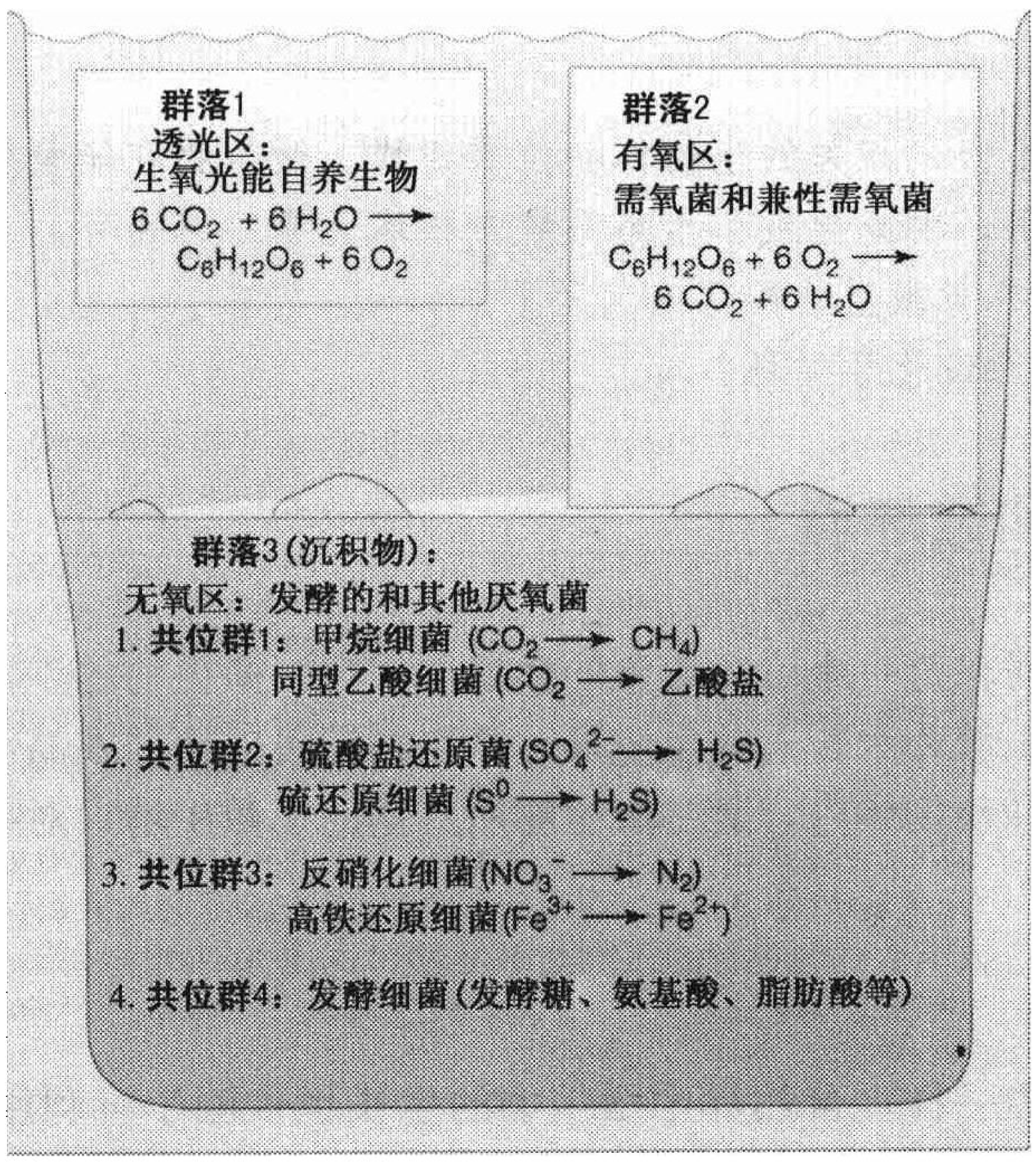


图 19.1 种群、共位群和群落——一个湖泊生态系统中，微生物群落结构的例子。微生物群落由不同种细胞的种群组成，这里显示的是一个湖泊生态系统存在各种群落。对于沉积物群落，显示了主要的共位群，CO_2、SO_4^{2-}、S^0、NO_3^-、Fe^{3+} 的还原是厌氧呼吸的例子，在 17.13～17.18 节中讨论。

能量以日光、有机碳或还原无机物的形式进入生态系统。光养生物利用光（见17.1～17.5节）合成新的有机物质（图19.1），它不仅含有碳而且含有氮、磷、硫、铁和其他元素。这些新合成的有机物以及从外界进入生态系统的有机物控制着化能有机营养生物的代谢活动。相反，化能无机营养菌从无机物电子共体获得能量，如H_2、Fe^{2+}、S^0或NH_3（第17章）。

生物地球化学循环

微生物对环境中几种元素，特别是碳、硫、氮和铁的再循环起着重要作用。研究这些化学转化称为生物地球化学（biogeochemistry）。生物地球化学循环（biogeochemical cycle）描述生态系统中这些关键元素的循环是由生物和化学试剂催化而发生的转化。当元素在生态系统中移动时（图19.1），通常这些循环涉及氧化还原反应（见5.6节）。例如硫，它的硫化氢（H_2S）形式可以被各种微生物包括光能营养型和化能营养型氧化成硫（S^0）和硫酸盐（SO_4^{2-}），硫酸盐是植物的主要营养，反过来，硫酸盐可以被硫酸盐还原细菌还原为硫化物，由再生的硫化物结束了硫的生物地球化学循环（图19.29）。

各种类型的微生物与生物地球化学循环是密切相连的，在许多情况下，微生物是唯一的生物制剂，具有使多种元素再生的能力，这些元素可被其他生物，特别是植物利用。在这一章我们将讨论多种生物地球化学循环，包括碳、氮、硫和铁。

概念检查

微生物群落是由代谢相关的生物体共位群组成。微生物在能量转化和生物地球化学过程中起着巨大作用，由此导致了生态系统最根本元素的再循环。

- 微生物共位群与微生物群落有何不同？
- 什么叫生物地球化学循环？

19.2 环境和微环境

微生物可以栖居在每一个可以想象的生境中生存。微生物的生境非常不同，而且通常快速变化，除了土壤和水普通的生境外，微生物还可以栖居在高等生物的表面，有时也可以生活在植物和动物体内，通常微生物所到达的多数生境，对植物和动物的营养是有利的。

微生物与微环境

正如实验室培养一样，自然界中微生物的生长也依赖于可利用的资源（resource）（营养）和生长条件（growth condition）（表19.1）。一个生境的不同资源的类型和数量以及生理化学条件决定了每种特定微生物的小生境（niche）。生态学理论认为每一种生物体生存在至少一个小生境中，即主要小生境（prime niche），在此处生物体生长得最好。生物体占据着主要小生境，同时也可栖居在其他小生境中，但不如在主要小生境生长得好。地球上存在无数微生物小生境，并且对我们今天所看到的微生物代谢多样性

（第 17 章）和生物多样性的进化（第 12～14 章）起着部分作用。

表 19.1 自然界中微生物生长所获得的主要资源和条件

资源	条件
碳（有机的、CO_2）	温度：冷→温→热
氮（有机的、无机的）	水势：干燥→潮→湿
其他常量营养物（S、P、K、Mg）	pH：0→7→14
微量营养物（Fe、Mn、Co、Cu、Zn、Ni）	O_2：有氧的→微氧的→无氧的
O_2和其他电子受体（NO_3^-、SO_4^{2-}、Fe^{3+}等）	光：亮光→暗光→黑暗
无机电子共体（H_2、H_2S、Fe^{2+}、NH_4^+、NO_2^-等）	渗透条件：淡水→海水→高盐度水

因为微生物形体微小，所以它们的生境也微小，微生物生态学家用微环境（microenvironment）一词来描述微生物实际生活和进行新陈代谢所在的生境。因此，当微生物学家在研究环境中的微生物存在时，必须学会“想到微小”。例如，对于一个典型的 3μm 大小的棒状细菌，3mm 的距离是巨大的，该距离等同于人要经历 2km 的距离。并且跨越 3mm 距离，可能会存在对生物活动有很大影响的化学和物理梯度。

例如，在一个 3mm 大小的土壤颗粒中，由于化学和物理等因素的不同，可以存在几种不同的微环境。试着想象一下，土壤颗粒中重要微生物营养如氧的分布。微电极（microelectrode）（见 18.7 节）可以穿过小的土壤颗粒，测量氧的浓度。正如实际实验所显示的数据（图 19.2），土壤颗粒就其氧含量来讲是不均一的，其外带氧含量最丰富，说明 O_2存在，而距外带很近的中心部分可完全缺氧（图 19.2）。

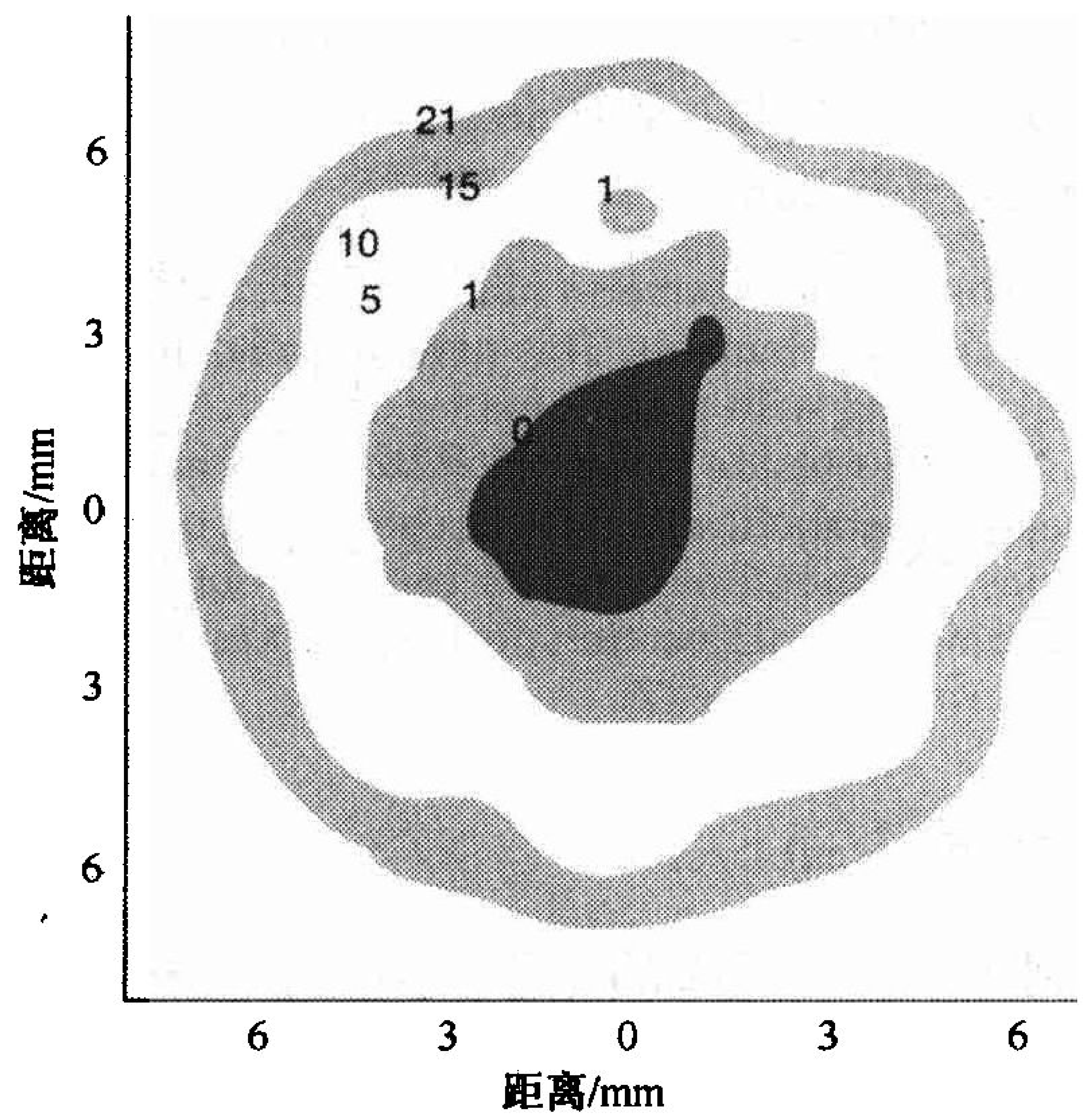


图 19.2 土壤颗粒中氧浓度的等高线图。横纵坐标表示土壤颗粒的大小，等高线上的数字表示氧浓度（以百分比表示，空气中氧为 21%）。就氧气和微生物关系而言，每一条带可以认为是一个不同的微环境。

我们知道跨越很小的空间距离就可存在着不同的小生境，这也是为什么不同生理类型的微生物可以共存在一个单独的“土壤颗粒”中（图 19.2），厌氧生物可以生活在土壤颗粒的近中心部位，稍向外部微需氧细菌（需要非常低氧的需氧菌）生长活跃，专性好氧生物可以在土壤颗粒最外层并且富氧区域进行生长代谢，兼性需氧菌可以分布在土壤颗粒的各个部位（见 6.15 节）。

微环境的物理化学条件在时间和空间上可以很快地改变。图 19.2 显示的氧浓度是瞬时测量的数据，按照微生物的呼吸时期，或是在土壤水分含量增加以后进行测量，可以显著显示出横跨微环境的氧的不同梯度。由此可以得出结论，微环境是非均质的，而且在一个给定的微环境中其条件变化很快。以这种方式微环境在一个相对小的自然区域内，可以提高微生物多样性。

营养水平和生长速率

营养（或在生态学上称为资源，表 19.1）是以间歇的方式进入生态系统中的。丰富营养时期，如枯枝落叶或死鱼或动物尸体的一起涌入，之后可能就是营养丧失的时期。自然界中的微生物经常面临着“营养过剩或营养贫乏”，因此许多微生物在营养充足时，产生储藏多聚体（storage polymer）以作为储备物质。储藏多聚体在营养过剩时储存起来，在营养缺乏时再利用，储备物质包括聚 β-羟基丁酸盐和其他的链烷酸酯、多糖、聚磷酸盐等等（见 4.11 节）。

自然界中的微生物对数生长是罕见的，短时间、快速地生长与营养的可利用性是紧密相连的，因为自然界中的物理化学条件不可能同时适合所有生物，因此大部分时间，微生物在自然界中的生长速率都低于实验室中的最大生长速率。例如，肠胃中的大肠杆菌一个世代的时间大约为 12h（每天分裂两次），而在纯培养中，它生长很迅速，在最适条件下，最短一个世代时间为 20min。

而且，从估计值显示出一般土壤细菌在自然界的生长速率要低于在实验室中测得的最大生长速率的 1%。总的来说，这种低的生长速率反映出①营养（资源，表 19.1）是低水平提供的或生长条件不是最适宜的；②微生物生境的营养分布是不均一的；③除了特殊的情况，在自然环境中微生物是混合种群生长，而不是纯培养，因此纯培养生长快的微生物在自然环境中生长较差，它必须与其他微生物竞争更好地适于营养和生长的条件。

微生物的竞争作用和协同作用

微生物之间为了可利用资源而发生的竞争作用是非常剧烈的，其结果取决于几个因素，包括营养吸收的速率、自身的代谢速率和最终的生长速率。不同微生物的混合体构成了一个典型的生境（图 19.1），每个群落的密度取决于目前生境与其主要小生境相近度。

不像为了同一资源而直接竞争的某些微生物那样，有些微生物可以共同完成转化过程，但不能单独完成，这种微生物相互关系类型称为互养共栖（syntrophy）（见 17.21 节），这对于某些厌氧细菌是关键的，在 19.10 节将介绍。从进行互补代谢的生物体活动中也可以看到代谢的协同作用。例如，我们在第 17 章讨论的两个较远生物种群的代

谢转化，亚硝化细菌和硝化细菌它们共同氧化 NH_3形成 NO_3^-，而不是由某一种单独能够完成的（见 17.12 节），因为亚硝化细菌（NO_2^-）的产物是硝化细菌的底物，这类生物体以密切关系生活在自然界中（图 18.12a）。

概念检查

微生物很小，同样它们的生境也很小。微环境是指微生物实际生存的地方。自然界中的微生物经常面临着营养过剩或营养缺乏，因此只有具有很好适应能力的种才能在一个小生境中生存繁殖。在许多微生物的相互关系中微生物间的协同作用也是比较重要的。

- 哪些方面限定了某种特定微生物的小生境？
- 生物体的许多不同生理种群为什么能生存在一个单独的生境中？

19.3 微生物的表面生长和生物膜

表面是重要的微生物生境，因为环境中的养料可以吸附到上面。这样表面上的微环境，其营养水平要比在溶液中的营养水平高许多，其结果是表面上微生物数量和活动通常比在自由水中要大得多。

显微镜载玻片可以作为生物附着和生长的表面，特别是将载玻片浸在一个微生物生境中，停留一段时间后取出，并在显微镜下观察（图 19.3a)。小菌落很容易在这样的表面发育，其情况与它们在自然界的天然表面发育是一样的。实际上，对浸渍的载玻片定期镜检可以用于测量自然界中贴壁生物的生长速率（图 6.20b)。

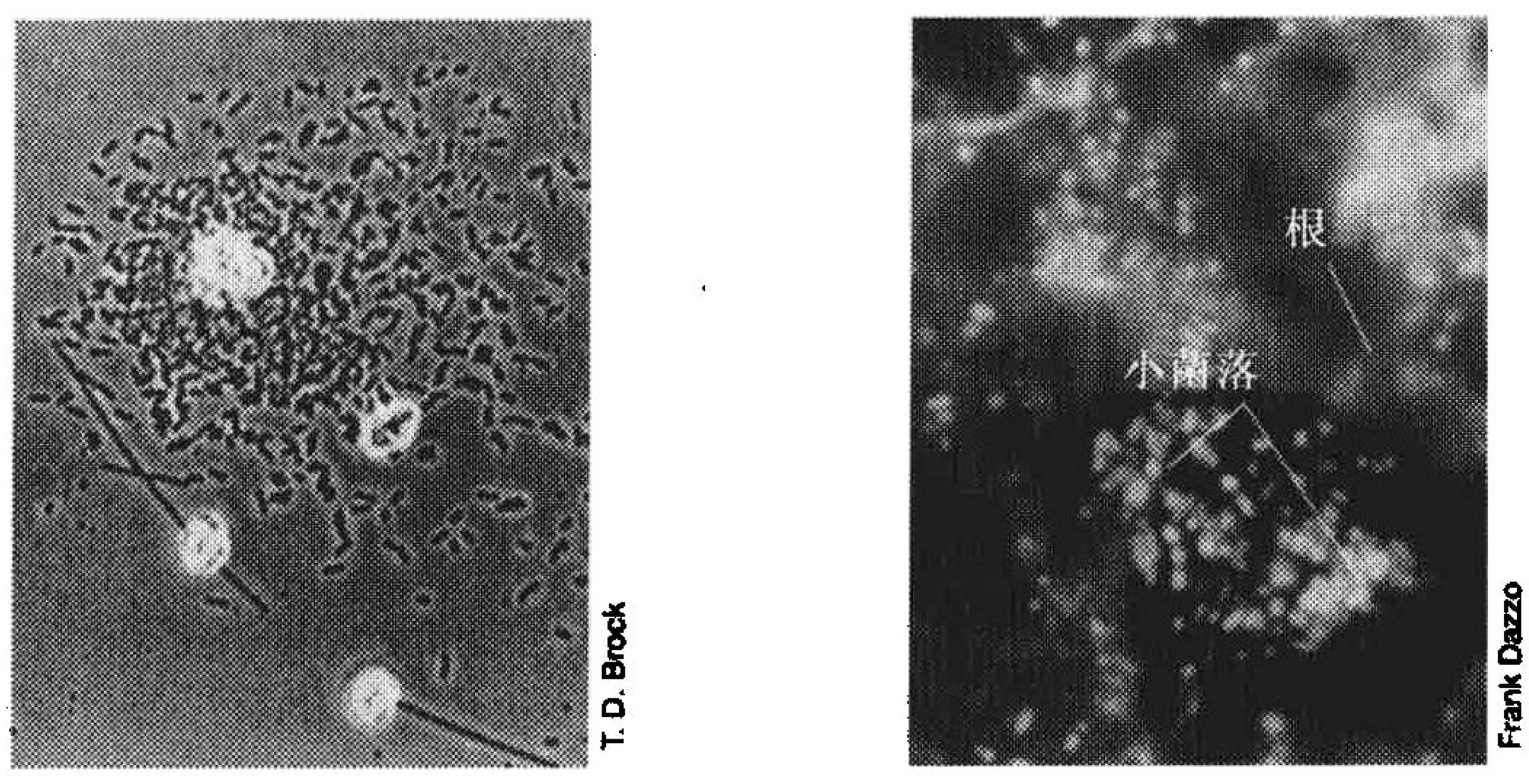


图 19.3 表面上的微生物。(a) 浸没小河水后的显微镜载玻片上所发育的细菌小菌落。明亮的颗粒是无机物质，短的，棒状细胞长约 3μm。(b) 聚集在土壤植物根部的一个天然微生物群落的荧光显微照片。注意小菌落发育，标本是用吖啶橙染色。

表面本身也是一种营养。例如，一个有机物质颗粒，微生物附着在其表面可以直接分解颗粒表面的营养物；又如，土壤中的微生物会很快地聚集在植物上，用简单的染色方法就可以鉴别出附着在其表面的微生物种群（图 19.3b)。

生物膜

通常微生物生长在被生物膜（biofilm）覆盖的表面上——集聚的细菌细胞附着在表面并且被细胞分泌的黏多糖所包裹（图 19.4）。生物膜可诱捕营养使微生物种群生长，同时还可帮助阻止表面上的细胞在流动的系统中脱离（图 19.5）。典型的生物膜含有许多多孔层，可以利用激光共聚焦扫描显微镜对每一层微生物进行镜检（见 4.2 节，图 19.4）。

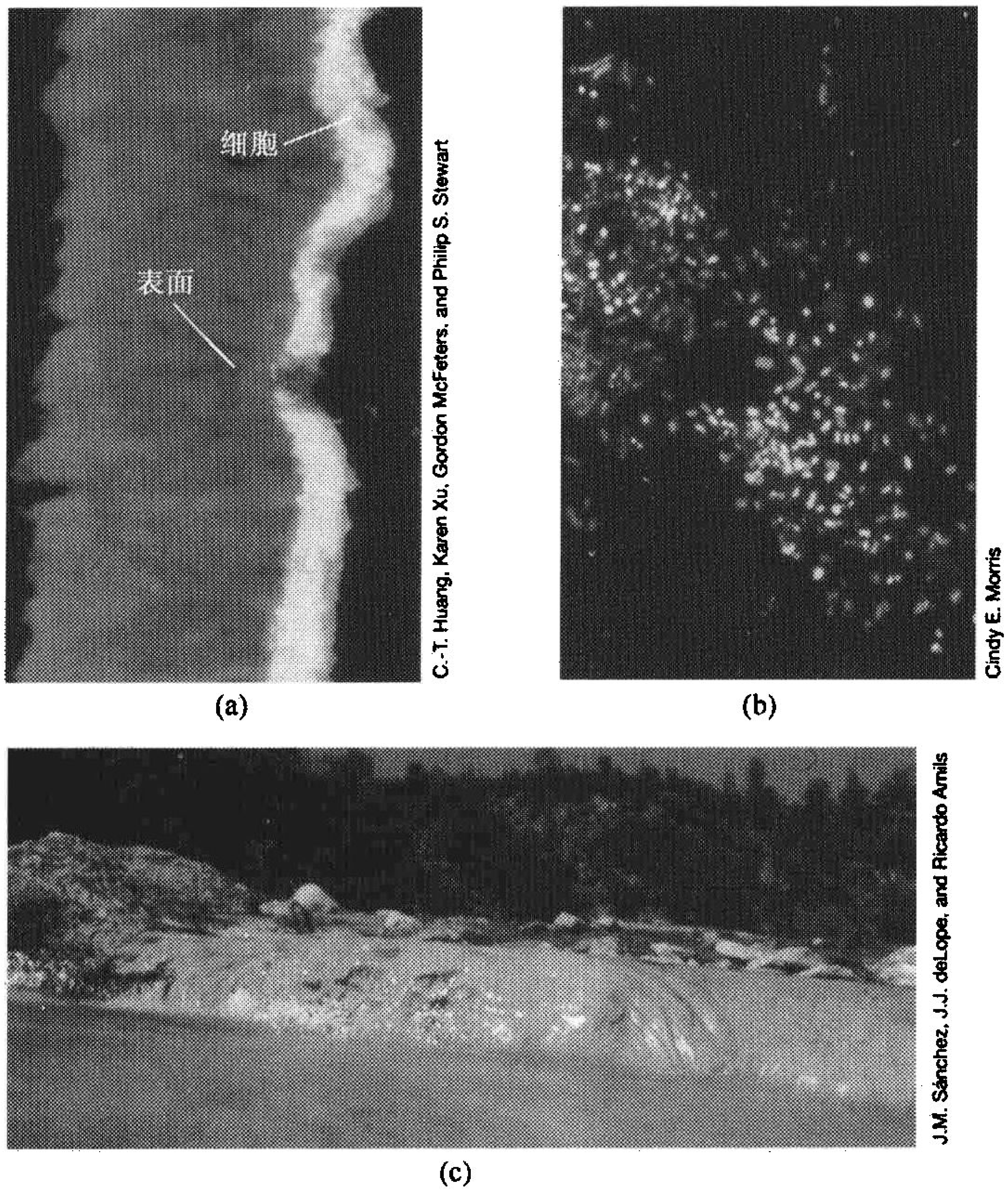


图 19.4 微生物生物膜。（a）铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）形成的实验生物膜的横切面。黄绿色层（约 15μm 宽）含有细胞，并通过碱性磷酸酶进行酶活性染色，红色面是表面。（b）叶子表面形成的天然生物膜的共聚焦扫描激光显微照片（见 4.2 节）。细胞颜色说明它们在生物膜中的深度。红色，表面上的细胞；绿色，9μm 深；蓝色，18μm 深。（c）西班牙，Rio Tinto 富铁岩石表面上铁氧化原核生物的生物膜。当富含 Fe^{2+} 的水流过并穿过生物膜时，铁氧化微生物将 Fe^{2+} 转化为 Fe^{3+} 获得能量（见 17.11 节）。

细胞与细胞之间的通讯联络对于生物膜的形成和维持是很关键的。附着在表面的细胞是生物膜与特异基因表达的一个信号，编码蛋白质的这些基因合成细胞与细胞信号分子并起始多糖形成（图 19.5a）。铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）是一个著名的生物膜形成菌（图 19.4a），主要的信号分子是称为高丝氨酸内酯（homoserine lactone）的复合物，当这些分子积累时，其功能作为趋化剂吸收附近铜绿假单胞菌细胞

（称为密度感应机制，见 8.10 节），并形成生物膜（图 19.4a），铜绿假单胞菌已显示与囊性纤维化疾病有关，该病在肺部形成紧密的生物膜，导致肺炎的症状（见 8.10 节和 31.7 节）。

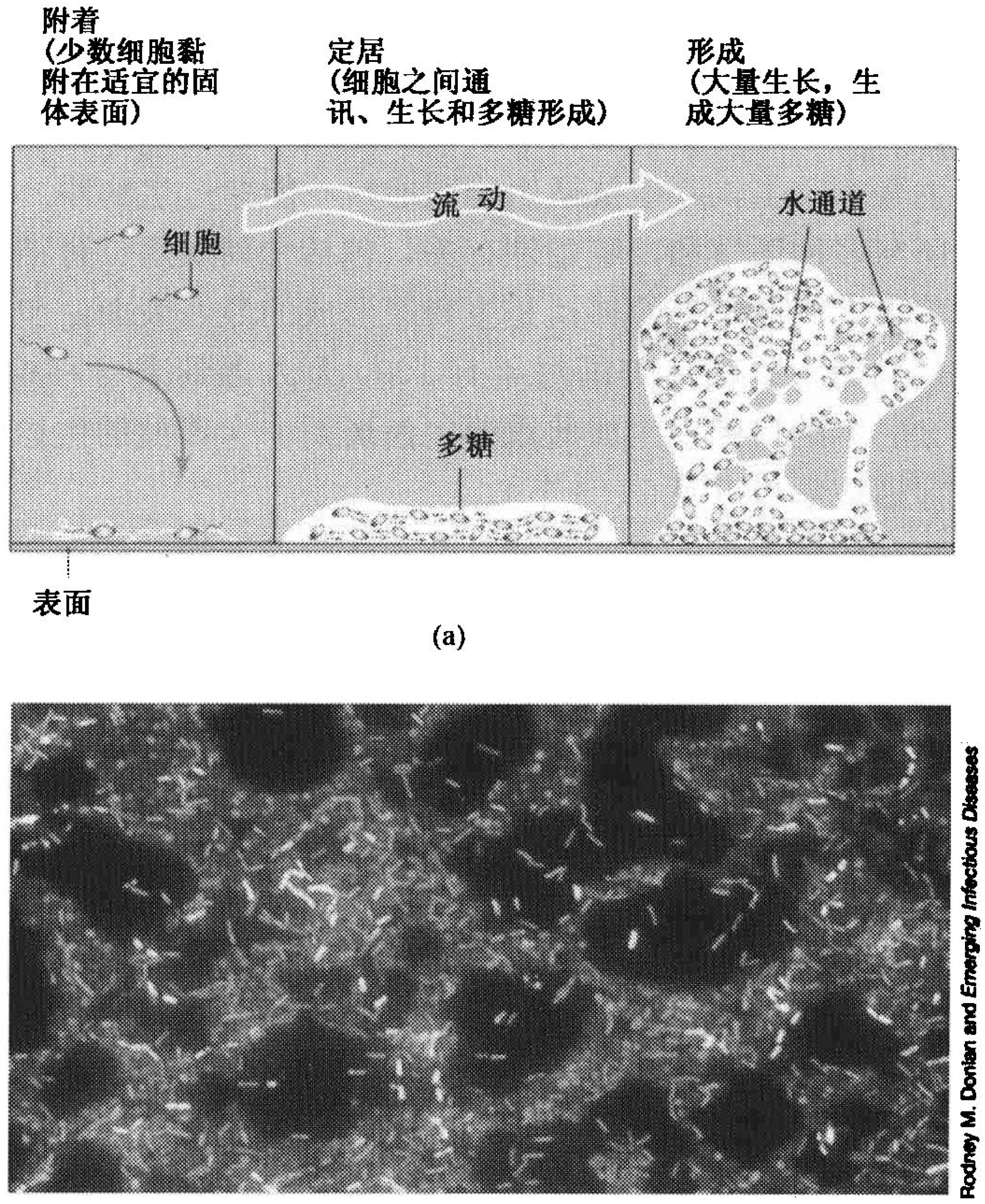


图 19.5 生物膜。（a）细菌生物膜的形成。生物膜起始于少数细胞的附着，然后生长并发生细胞通讯联络，当生物膜生长时多糖形成并变得更广泛。（b）被 DAPI 染色（见 18.3 节）的不锈钢管上形成的生物膜显微照片。注意水通道。

细菌为什么会形成生物膜？

细菌形成生物膜，因为生物膜生长模式无疑有助于生物体的生存和生长，形成生物膜至少有 4 个原因：①生物膜是一种防御类型，它可以抵抗将细胞清除的外力、抵抗免疫系统对细胞的吞噬作用或有毒分子的渗透，如抗生素；②生物膜形成使细胞保持在一个有利的小生境，生物膜附着在富含营养的表面，如动物组织，或在流动系统的表面，如小溪的岩石上（图 19.4c），固定细菌细胞的位置通常营养非常丰富或连续不断地补充；③生物膜形成是因为可以使细菌细胞相互间进行紧密联系地生活，正如我们在铜绿假单胞菌生物膜中所见到的，通过感应分子促进细胞通讯联络，这种方式有利于细胞，而且，当细胞非常接近时，遗传交换的机会就会提高；④生物膜是自然界细菌细胞生长

的典型方式，自然界中的营养浓度不同于培养基，换句话说，相对于在实验室中拥有更丰富的人造培养基的液体培养方法来讲，在自然界中的原核生物，其生物膜的生长是默认的。

生物膜控制

生物膜在医学和商业上也有显著的作用。在人体内，包裹在生物膜中的细菌细胞可免受免疫系统和抗生素的攻击，其他抗微生物剂通常不能穿过生物膜。生物膜除了与囊性纤维化有关外，还与多种医学和口腔条件有关，包括牙周疾病、肾结石、结核病、军团杆菌病和葡萄球菌感染。医学上的移植是生物膜形成的最好表面，包括尿导管这种短期设备和人工关节长期植入。估计美国每年有 1000 万人遇到来自移植的生物膜感染。生物膜解释了为什么通常的口腔卫生如此重要，齿斑是一个典型的生物膜，含有细菌产生的酸性物质，使牙形成龋齿（见 21.3 节）。

在工业上，生物膜使管道中的水、油或其他液体流速减慢，加速管道的腐蚀，同时也可使被水浸没的物体，如岸边的钻井机、船和沿岸设施的结构组件等腐朽。饮用水的安全性也会由于水管生物膜的存在而受到危害，美国许多水管已近 100 年，尽管水管生物膜多数含有无害的细菌，但是如果病原菌成功地聚集在生物膜上，那么标准加氯消毒法就不能有效地杀死它们，然后细胞周期性释放可以导致疾病的暴发。霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）（见 28.5 节）是霍乱的病原体，可能就是以这种方式繁殖的。

生物膜控制是一个巨大的商机，至今只有一些有限的方法可行。总的来说，工业上每年花费十亿美元治理管子和其他表面来消除生物膜。目前，已发明的新的抗生素可以渗透生物膜，其他药物则通过干扰细胞通讯来阻止生物膜形成。例如，称为呋喃酮（furanone）的一类化学物质显示了在非生物表面试验中预防生物膜形成的前景，因为呋喃酮是稳定的，而且对人无毒，它们也可以应用在人类医学上作为抗生物膜剂。

概念检查

生物膜是在表面形成的包裹在黏液中的细菌聚集物，它可以破坏来自于细菌细胞分泌产物形成惰性的、活体表面。生物膜形成是一个复杂的过程，涉及细胞与细胞的通讯联络。

◆ 生物膜基质的化学性质是什么？

◆ 为什么生物膜是生活在流动系统中的细菌细胞一个较好的生境？

◆ 请给出一个大多数人可能具有的与医学相关的生物膜的例子。

Ⅱ 土壤和淡水微生物生境

微生物的主要生境是土壤和淡水，后者包括湖泊、池塘和溪水。土壤和水在物理结构、营养组成、温度和水势上是不同的，所有这些因素结合起来影响所存在微生物的多样性和数量。

19.4 陆地环境

土壤一词是指地球表面疏松的外部物质，该层明显不同于位于下面的基岩（图 19.6)。土壤形成的过程包括土壤的母体材料（岩石、砂子、冰迹等）、地形、气候与生物之间的复杂相互作用。土壤可以分为两大类——矿质土壤（mineral soil）和有机土壤（organic soil)，它们分别取决于最初是否来源于岩石和其他无机物质的风化作用或是泥炭地和沼泽地的沉积作用。我们将主要讨论矿质土壤，这是大多数陆地环境的主要土壤。

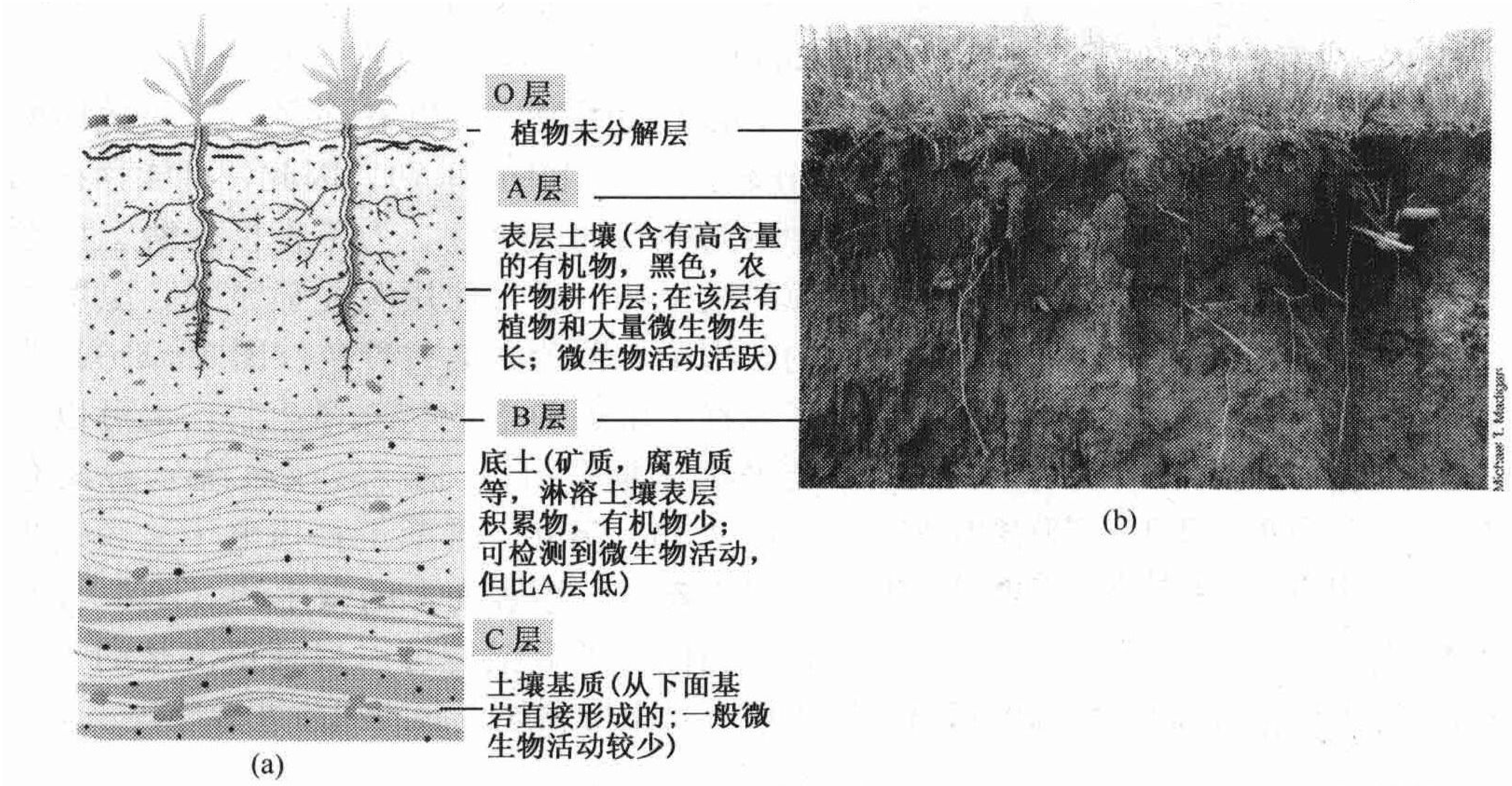


图 19.6 土壤。(a) 成熟土壤的剖面图。土壤科学家把土层定义为土壤带。(b) 土壤剖面照片显示 O、A 和 B 层。该土壤来自于伊利诺斯州 Carbondale，富含黏土，因此含有非常小的颗粒，并且是非常紧密的。这种土壤不如含有沙子作为主要成分的土壤渗水效果好。

土壤形成

土壤形成是物理、化学和生物共同作用的结果，几乎任何的裸露岩石都可发现藻类、地衣（见 19.20 节）或藓类植物的存在。这些生物在干燥岩石上保持或接近休眠状态，然后在湿度适合时开始生长，它们是光合营养菌，能产生有机物，这些有机物使化能有机营养菌和真菌生长。

化能有机营养菌数量直接随着植被程度的增加而增加。由化能有机营养菌呼吸作用产生的二氧化碳转变成碳酸（$CO_2+H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$)，这在岩石溶解中很重要，特别是石灰岩。许多化能有机营养菌也分泌有机酸，这些酸类进一步促进岩石溶解成细小的颗粒。

冷冻、融解和其他物理过程可以导致岩石裂缝。原始土形成在这些裂隙中，先锋植物可以在此生长，植物的根系进一步进入裂隙从而使岩石的碎裂作用增强，并且植物根系的分泌物促进了根际（rhizosphere）（植物根部周围的土壤，见图 19.3b）微生物区系的发展。当植物枯死后，它们的残骸进入土壤，并且作为养料使微生物更为广泛的发

育。矿质进一步发生溶解，当水渗出时，可携带一些化学物质进入到更深层。

当风化作用进行时，土壤的厚度增加，从而使更大的植物和树木得以成长，同时土壤动物定居下来，并在使上层土壤保持混合和通气中起了重要作用。最终，物质的向下运动导致土层形成，称为土壤剖面（soil profile，图 19.6）。典型土壤剖面形成的速率取决于气候和其他因素，但一般需要数百年的时间。

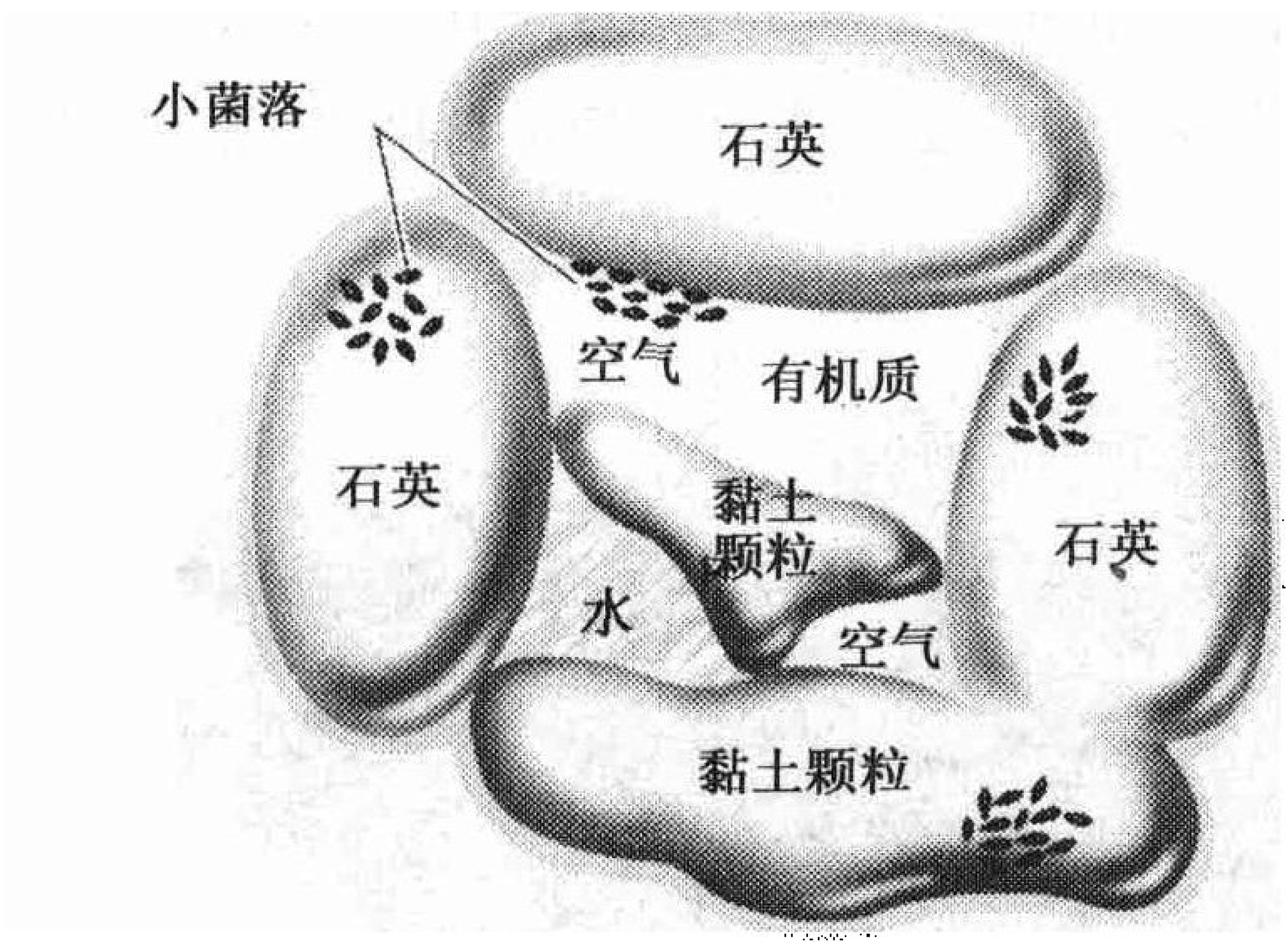


图 19.7 由矿物质和有机化合物组成的土壤团聚体，显示了土壤微生物的位置。 在土壤溶液中几乎没有发现游离的微生物；它们中的大多数是以小菌落附着在土壤颗粒上。

作为微生物生境的土壤

在土壤颗粒的表面出现大量微生物生长，通常在根周围（图 19.2，图 19.3b 和图 19.6b）。正像 19.2 节所指出的那样，甚至一个小的土壤团聚体可以有许多不同的微环境（比较图 19.2 和图 19.7），因此，可能存在几种不同类型的微生物。为了直接观察土壤颗粒的微生物，通常使用荧光显微镜，土壤中的生物用一种荧光染料着色（图 19.3b）。为了观察土壤颗粒上的特殊微生物，也可以用荧光抗体染色（图 18.8）或系统发育染色（图 18.4）。另外，借助于扫描电子显微镜也可以观察到土壤表面上的微生物（图 19.8）。通过扫描电子显微镜可以得到很清楚的土壤细菌的形态学信息，同时扫描电子显微镜也可以对土壤颗粒表面的细菌进行计数。

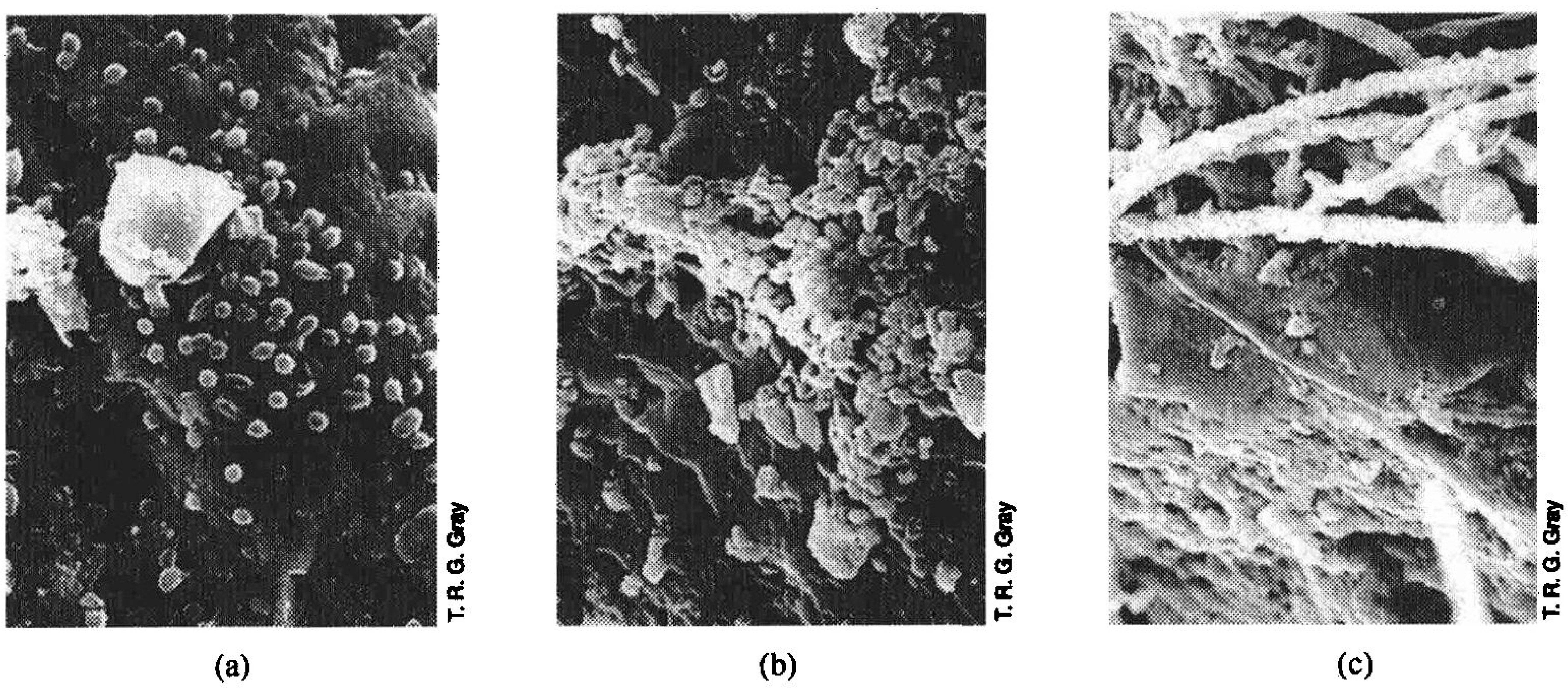


图 19.8 利用扫描电子显微镜观察到的土壤颗粒表面上的微生物。 (a) 短的、杆状细菌的小菌落。(b) 放线菌孢子（见 12.24 节），图 a 中的细胞和图 b 中的孢子 1～2μm 宽。(c) 真菌菌丝。真菌菌丝约 4μm 宽，包裹有矿物质。

影响土壤中微生物活动的主要因素之一是能否得到水的问题。以前我们讨论过水对微生物生长的重要性（见 6.14 节）。水是土壤中高度可变的成分，土壤中水分的储存量取决于土壤组成、雨量、河流的流域和植物覆盖率。保持土壤水分有两种方法：①水被

吸附在土壤表面上；②在土壤颗粒之间以薄片或薄膜形式存在的自由水。

存在于土壤中的水有各种物质溶解其中，这个混合物称为土壤溶液（soil solution）。在排水通畅的土壤中，空气很容易透入，同时土壤溶液的氧溶解度很高，而在渍水土壤中，只有少量氧气溶解在水中，而且很快被微生物所消耗，这类土壤迅速变成缺氧的土壤，说明其生物学性质已经发生了深刻的变化。我们已在 19.2 节和图 19.2 中讨论了氧与土壤微环境的关系。

土壤的营养状况（资源，表 19.1）是影响微生物活动的另一个主要因素。微生物活动最多的地方是富含有机质的土壤表层，特别是靠近植物根际的区域（图 19.6b）。土壤微生物的数量和活动很大程度上取决于土壤中所存在的营养平衡，土壤中的碳源是无机营养，而不能像氮、磷一样成为限制微生物繁殖的营养因素。

深层微生物学

由于对地下水化学、污染物潜在的渗透和污染物在地下水蓄水层转移的兴趣，导致了人们对微生物在深层陆生环境中作用的研究。深层土壤可以延伸到土壤表面几百米以下，它不是一个微生物荒地。尽管细胞数量比土壤 A 层（图 19.6）少得多，但各种微生物主要是细菌，存在于深层地下土壤中。例如，钻洞到 300m 无菌取样的样品，经划线分离，可以发现各种原核生物，包括厌氧菌如硫酸盐还原菌、产甲烷菌和同型乙酸细菌（见 17.15～17.17 节）及各种好氧菌、兼性厌氧菌。

假设深层土壤中的微生物因为有地下水流过它们的生境而易于获得营养，但活性测定显示出，这些细菌的代谢速率要比它们在自然生境（见知识窗：地下深层微生物的生活）中的代谢速率慢得多。与土壤上层的微生物相比，深层土壤的微生物的生物地球化学作用可能是最低限度的，然而经历很长的一段时间，这些地下微生物的代谢活动可能承担有机化合物的缓慢的矿化作用，并且把代谢产物释放到地下水中。

利用深层微生物对从土壤渗透到地下水中的有害物质（如苯和农用化学药品）进行原位生物降解是目前的热点课题。添加无机营养的结果可以刺激这些化学物质的生物降解；将特异微生物导入受污染的蓄水层可以提高生物降解。

概念检查

土壤是一个复杂的生境，有许多微环境和小生境，土壤中存在的微生物主要附着在土壤颗粒表面，影响土壤表面微生物活动最主要的因素是可利用的水，而深层土壤（深层环境）营养也起着重要作用。

◆ 矿质土壤和有机土壤两者有什么不同？

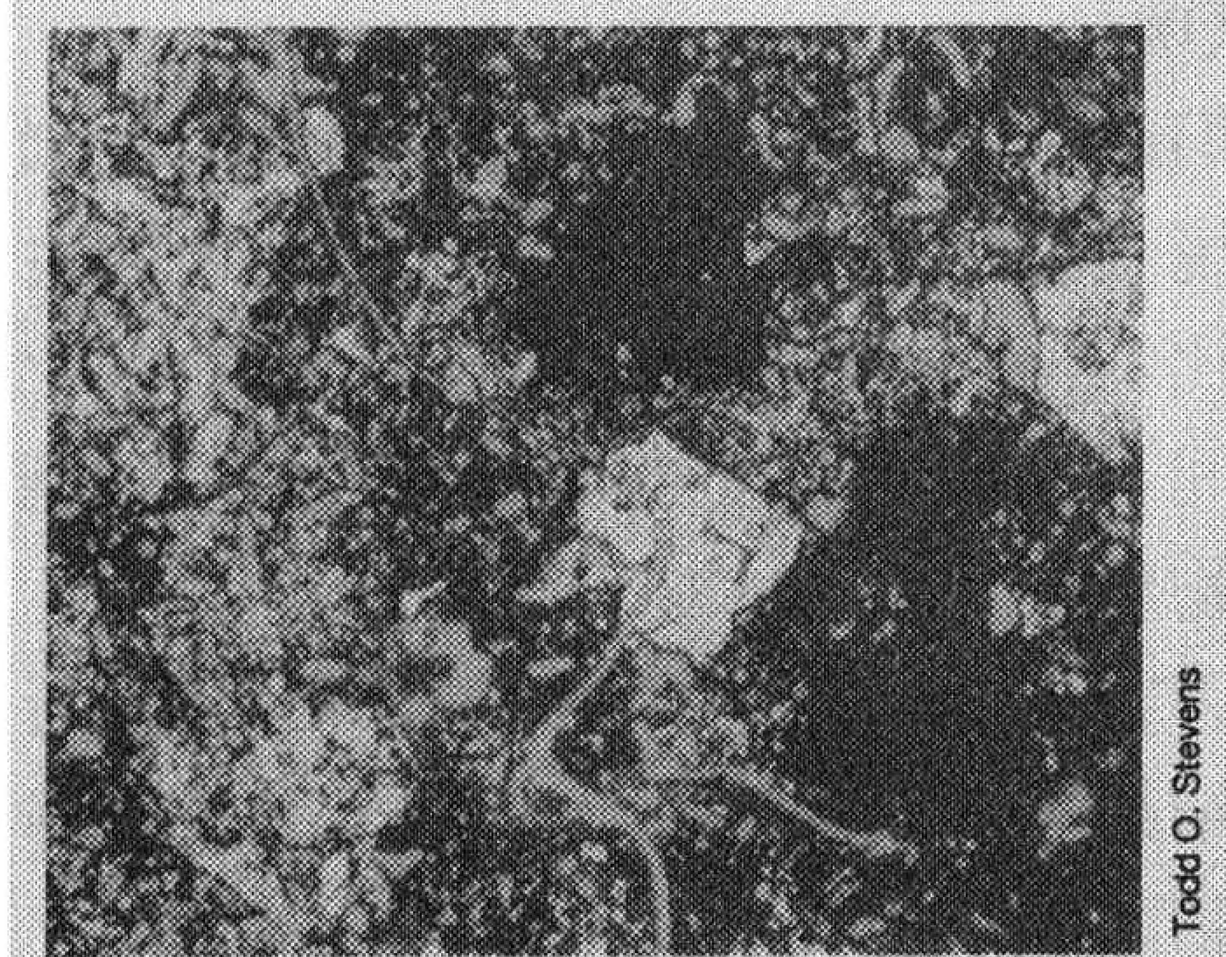
◆ 控制土壤微生物活动的程度和类型有哪些因素？

◆ 土壤的哪个区域是微生物最活跃的区域？

知识窗：地下深层微生物的生活

研究陆地深层的微生物学家发现在表层几千米以下的不同的物理和化学环境中有活的原核生物存在，这些微生物是如何生活的呢？最初的研究结果表明这些埋藏于地下的微生物是生长非常缓慢的化能有机营养细菌，它们以缓慢分解储藏在沉积物中的有机碳源为生。但通过研究深层的玄武岩蓄水层[1]的微生物生态学表明缓慢生长的化能有机营养菌不是生活在深层地下唯一的原核生物，这也存在化能无机营养原核生物，实际上可能是地下主要的微生物种群。

玄武岩是富含铁的、基本上没有有机物的火山岩，从哥伦比亚河（美国华盛顿）某一玄武岩向下 1500m 深处，发现许多厌氧菌和化能无机营养菌（图 1a），包括硫酸盐还原细菌、产甲烷菌和同型乙酸细菌[1]，因此，在深层生态系统中发现了细菌和古生菌两种类型。通过对存在于岩石和周围地下水中甲烷（CH_4）的稳定碳同位素分析，显示出产甲烷菌具有代谢活性，测定结果说明富含较轻碳同位素（^{12}C），是一种典型的生物产甲烷作用（见 18.8 节）。如果产甲烷菌有活性，很可能其他种群也有活性。但硫酸盐还原细菌的产物 H_2S 和同型乙酸细菌的产物乙酸（图 1b）不积累，因为它们被其他微生物所消耗，包括能利用乙酸的硫氧化化能无机营养菌和各种化能有机营养菌。



(a)

产甲烷作用：$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$

乙酸形成：$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$

硫酸盐反应：$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$

假设无机物

产H_2：$FeO + H_2O \rightarrow H_2 + FeO_2$

(b)

图 1　地下深层微生物的生活。（a）附着在 1500m 深层地下的玄武岩碎片表面的微生物生物膜的激光共聚焦显微照片。当尼罗红染色的细菌细胞为红色时，而从玄武岩表面光反射的为绿色，生物膜上细胞的生长是依赖氢的，反应如图 1b。（b）生长在无氧深层的玄武岩蓄水层的厌氧原核生物的主要代谢反应。

这些厌氧菌的一个共同代谢链是利用氢作为产能代谢的电子供体（见 13.3 节、17.9 节、17.14～17.18 节和图 1b），氢是有机物发酵分解的共同产物（见 17.19～17.21 节），但是如果玄武岩含有非常少的有机物，那么是从何处产生的氢来提供氢消费者的代谢呢？哥伦比亚河流玄武岩的氢明显地来自于岩石中铁矿石与氢严格的化

---

1 Stevens，T O and Mckinley J P. 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* 270：450～454

学作用（见图 1b 的反应），这种反应可从无机化学中了解到，并且在实验室中进行了实验，在无氧条件下，把压碎的哥伦比亚河流玄武岩与无菌水混合，很快就产生了氢蒸气[2]；也可在地下水渗到玄武岩的地方检测出氢。

因此，可能是地下深层玄武岩形成的氢是电子供体，它支持那里所发现的大量厌氧原核生物的生长，如果这是真的，那么这些生物经历了一种严格地球化学的生存方式，因为它们的电子受体（产甲烷菌和同型乙酸细菌是 CO_2，硫酸盐还原细菌是 SO_4^{2-}）和电子供体氢都来源于无机物。这些埋藏于地下的化能无机营养菌也可能是新的，在某种意义上，它们完全不同于光合作用的主要产物，后者是所有地表层存在的生物所需要的分子氧和（或）有机物的来源。

进一步的研究已经对哥伦比亚河流玄武岩的发现提出了疑问，这在科学上有时也会出现。虽然这些玄武岩没有更多的无机物质，但还是有一些，因此，发酵是各种深层 H_2 化能无机营养菌利用 H_2 的来源[2]。

不管 H_2 的来源，深层地下以 H_2 为基础的微生物生态系统的广泛性和生态学意义有待于进一步研究，但已清楚代谢上活跃地消耗 H_2 的微生物栖息在地下深层，反过来，说明它们可能是这些环境的重要生物地球化学因子。确实，我们现在怀疑地球深层整个原核生物数量是非常巨大的（见 1.3 节），实际上，比原核生物在所有的其他环境的数量都要大。这些深层地下生物的活动仍然是非常神秘的，但它们对地球的营养循环具有重要意义。

---

2 Anderson，R T，Chapelle F H and Lovely D R. 1998. Evidence against hydrogen-based microbial ecosystems in basalt aquifers. *Science* 281：976～977

19.5 淡水环境

典型的淡水环境是指湖泊、池塘、河川和泉水。淡水环境彼此间由于可利用的资源以及其他的化学和物理性质存在相当的不同，因此它们的微生物多样性也不同，这是不足为奇的。在多数水生环境中占优势的光合营养生物是微生物，在有氧（oxic）区域蓝细菌和藻类占优势，在缺氧（anoxic）区域不产氧光合营养细菌占主导地位。

漂浮或自由悬浮在水中的藻类称为浮游植物（phytoplankton），而附着在水底或边缘上的藻类称为海底藻类（benthic algae）。因为这些光合营养生物利用光能来产生有机物，所以它们被称为初级生产者（primary producer）。根据最后分析，水生生态系统的微生物活动力依赖于光合营养生物初级生产的速率。生氧光合营养菌产生新的有机物和氧气。如果光合作用活性非常高，过量的有机物导致氧气减少和缺氧条件，反过来会触发原核生物代谢形式的改变，特别是无氧呼吸和发酵（见 17.13～17.21 节）。

氧与湖泊和河流的关系

我们在 6.15 节中讨论了需氧和厌氧生活，在 17.5 节中讨论了通过光合作用产生氧，在 19.2 节中讲了微环境中的氧。尽管氧是空气中最丰富的气体之一（占空气的

21%)，但是它在水中的溶解度是有限的，并且大量水中的氧与空气交换缓慢。光合作用氧气的产生仅发生在湖泊或海洋的表层，该处有日光照射（图 19.1）。在表层不被消耗的有机物沉到深水处，由兼性微生物利用溶解于水中的氧气使有机物分解。

淡水湖泊中，氧气一旦消耗完，那么深水层就变成缺氧的环境，这里的严格需氧生物（如高等植物和动物）就不能生存，最底层含有厌氧原核生物和少数需氧真核生物，特别是含有原生动物。另外，有些从呼吸作用转变为发酵和产甲烷代谢，这是碳循环和其他营养循环的重要结果（见 19.9～19.11 节）。

水体变得是否缺氧取决于几个因素，包括存在有机物的数量和混合度。如果有机物稀少，如在原始的湖泊或远海区域，没有充足的底物来供化能有机营养菌消耗氧气，存在于这种环境的微生物是典型的贫营养生物，生物适应在非常稀薄的条件下生长。由于风混合作用而发生强烈的涨潮或湍流时，表层与深层的水可以充分地混合，由此，氧可以转移到水的深层。

相比之下，气候温暖地区的许多湖泊，在夏季大量的水变成叠层，表层温暖而且密度较小称为湖上层（epilimnion），与寒冷而密度较大的底层分开［称湖下层（hypolimnion)］（图 19.9）。温跃层（thermocline）是从湖上层向湖下层的过渡带。通常在初夏，在成层现象开始之后，底层变得缺氧（图 19.9），这种湖泊通常含有更高水平的被溶解有机物，这些有机物来自于湖泊周围陆地流失的营养物，可以引发藻类和蓝细菌水华，增加湖泊的有机物含量。

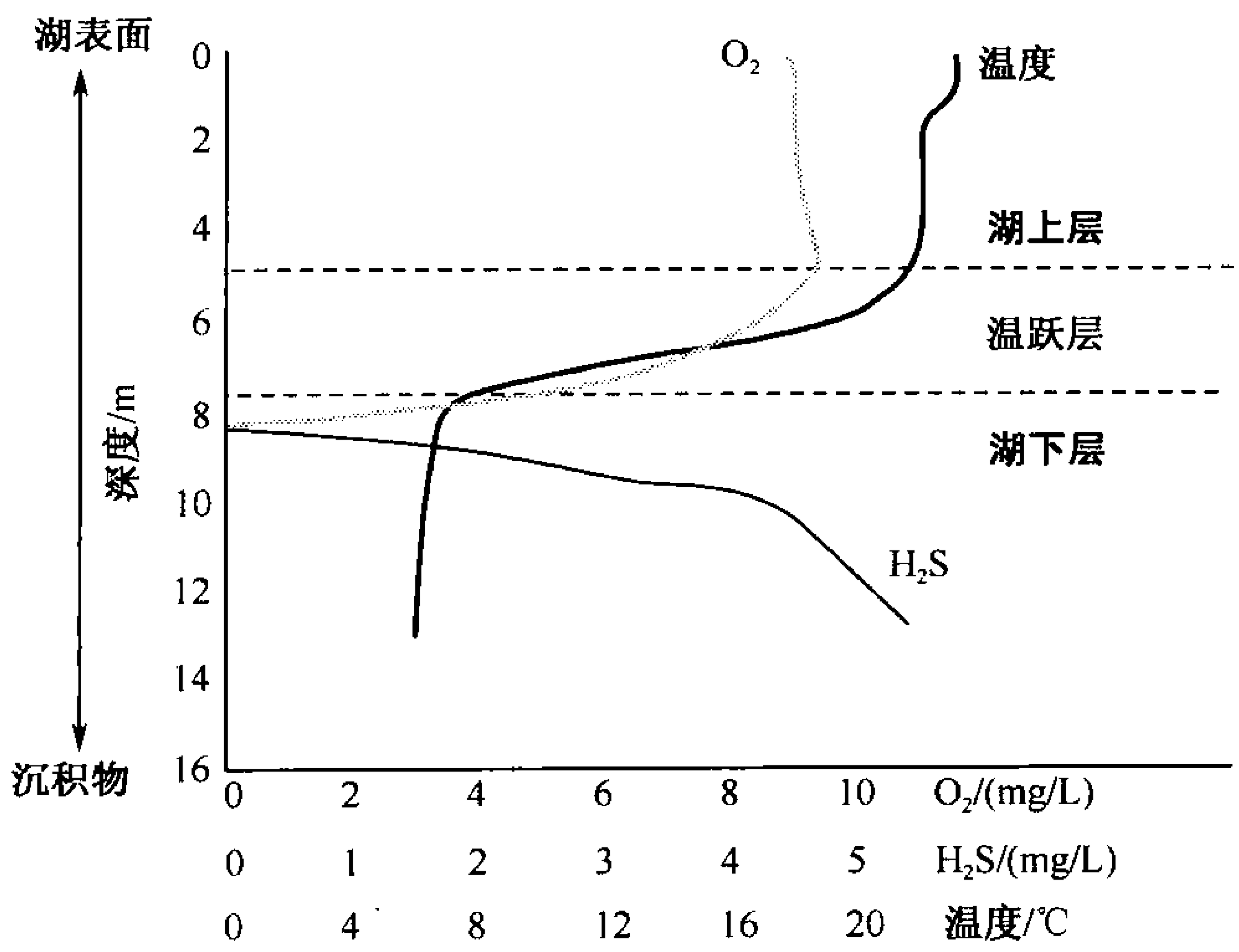


图 19.9　由于夏天的成层现象，一个温暖湖泊深层缺氧条件的形成。寒冷的底层水密度高，而且含有细菌硫酸盐还原作用产生的 H_2S。把温度变化较快的带称为温跃层。一般在秋末冬初，表层水变冷达到湖下层水或污水池的温度和密度，替代底层水，并影响翻腾。数据来自于美国华盛顿北部一个小的淡水湖。

秋末冬初，气候温暖地区的湖泊，表层水变得比底层的水寒冷而且密度更大，引起水“翻腾”，使底层水重新得到通气。这种一年四季的周期性循环使底层水从有氧到缺氧再回到有氧，微生物活动也随着氧气含量的改变而改变。但其他因素，特别是温度也

强烈地控制着微生物活动。

江河

氧与江河的关系是一个特殊的令人感兴趣的研究课题，特别是那些受污水、农业和工业污染的江河含有较丰富的有机物。尽管因为水流速很快或湍流可使江河水充分混合，但大量添加的有机物可导致由于细菌的呼吸造成明显缺氧（图 19.10a）。当污水从污水管中流出后，有机物被渐渐地消耗，因而氧含量又恢复到正常。

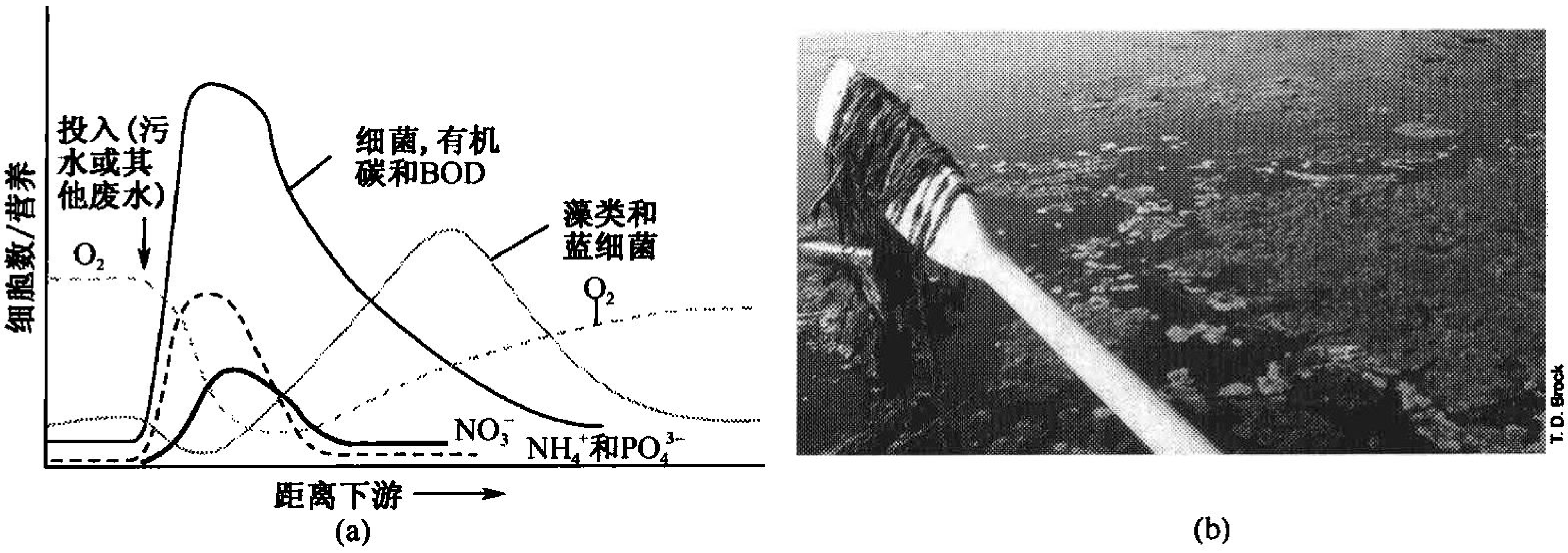


图 19.10　污水或其他富含有机物的废水投入水生系统后的效应。(a) 一个江河中，当有机物达到高峰时，立刻发生细菌数目的增加和氧水平的降低。例如，如果投入的污水含有 NH_4^+，那么由硝化细菌把 NH_4^+ 氧化成 NO_3^-（见 12.3 节、17.12 节和 19.12 节），注意当硝化作用两个阶段进行时，NO_3^- 升高后不久，NH_4^+ 是如何升高的。藻类和蓝细菌数量的增加主要是由于无机营养物，特别是 PO_4^{3-} 的缘故。(b) 富养湖泊美国威斯康星州麦迪逊市蒙大拿湖显示，藻类、蓝细菌和大型植物（水生杂草）的形成是对来自于农业流失的无机营养物污染的反应。死的植物和藻类物质含有非常高的 BOD，以至于虽然光养生物通过光合作用产生氧气，但是分解作用导致大规模氧气缺乏。

水体中氧气的缺失不是所希望的，因为许多水生动物在非常短暂的缺氧条件下会死亡。另外，在转变成缺氧条件后，导致厌氧细菌产生有气味的化合物（如胺类、H_2S、硫醇、脂肪酸），有些物质对高等生物是有害的。湖泊中，来自于污水或其他污染物的营养物投入也可以触发蓝细菌和藻类生成大量水华（图 19.10b），有机物的增加最终导致氧气缺乏。

生化需氧量

水体微生物耗氧特性称为生化需氧量（biochemical oxygen demand，BOD）。BOD 的测定法是采取水样，充分充气后，把它放在一个密闭的瓶中，培养一段时间（通常为 20℃，5d）后测定水中残余氧。BOD 可以测出水中有机物被微生物所氧化的量。因此当江河中有机污染物的污染被消除后，BOD 降低的同时伴随着溶氧量相应的增加（图 19.10a）。

因此，我们可以看出水体中的氧和碳循环是相关的，有机碳的水平与氧成反比，这在厌氧环境中特别明显，通常厌氧环境富含有机碳（见 19.9～19.11 节）。

概念检查

在水生生态系统中，光合营养微生物通常是主要的初级生产者，产生的有机物大多数被细菌所消耗，这可以导致环境中氧的缺失。BOD 是测定水体样本氧消耗的特征指标。

◆ 什么叫初级生产者？

◆ 在一个湖泊中，何谓湖上层，何谓湖下层？

◆ 向水样本中加入有机物，它的 BOD 是增加还是降低？

Ⅲ 海洋微生物学

海洋在许多方面不同于淡水环境，包括盐度、平均温度、深度和营养状态。通过使用微生物生态学的分子工具，特别是遗传染色和基因测序（见 18.4～18.6 节），发现了有关海洋微生物学的许多新信息。这里我们集中讨论 3 个关键话题：①广阔海洋中的原核生物；②深海微生物学；③支持深海热水流火山口附近动物生活的延伸微生物生态系统。

19.6 海洋生境和微生物的分布

与一般的淡水环境相比，广阔海洋的营养水平通常是非常低的，特别是氮、磷和铁这些关键的无机营养物。初级生产者的活性（主要是光合 CO_2固定）由于这些营养匮乏而受到限制，因此海洋中的细胞数量要比淡水生态系统低。但是，由于海洋是如此巨大，发生在那里所有的光合作用和氧气的产生是地球碳平衡的主要因素，海洋微生物群落影响着从海洋食物链到地球气候的各个环节。

初级生产力

在广阔的海洋，甚至在非常深的区域，多数初级生产力是由于原绿藻（Prochlorophyte）的光合活动产生的，原绿藻是含有叶绿素 a 和 b 的微小产氧原核生物。原绿球蓝细菌属（*Prochlorococcus*）（与蓝细菌有亲缘关系）是一类特异的重要初级生产者（图 19.11a 和 12.26 节）。在热带或亚热带海洋中也广泛分布着丝状的浮游海洋蓝细菌束毛蓝细菌属（*Trichodesmium*）（图 19.11b），束毛蓝细菌属细胞形成的丝状体组成了生物量的重要部分，悬浮在这些水域中。束毛蓝细菌属是一种固氮（nitrogen-fixing）蓝细菌，由这种生物产生的固氮作用被认为是海洋环境中氮循环（见 19.12 节）的一个主要环节。

伴随着沿岸水域中的原绿藻，发现了非常小的光养真核生物，其中一些是已知最小的真核细胞。例如，*Ostreococcus* 是一种极小的藻类，直径只有 0.7μm（图 19.11c），比大肠杆菌细胞还小！

近海区域比广阔的海洋水域的营养更丰富，因此可以供养更多的光养微生物种群

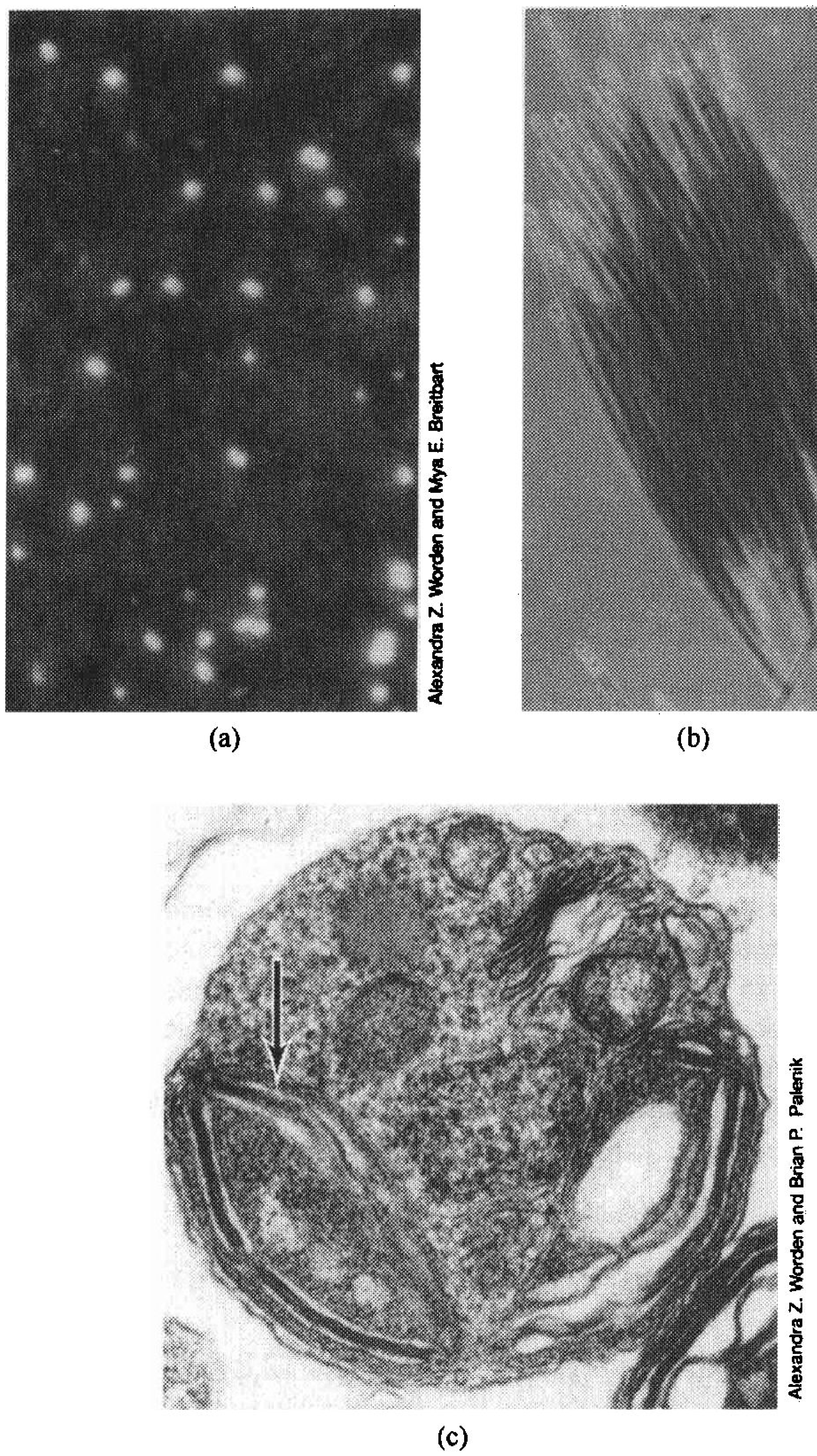


图 19.11　海洋生氧光能自养生物。(a) 在亚热带开阔海洋水域占优势的光能自养生物原绿球蓝细菌属（*Prochlorococcus*）细胞的荧光原位杂交系统发育染色（见 18.4 节）。(b) 固氮蓝细菌束毛蓝细菌属（*Trichodesmium*）。在世界范围的热带水域细胞形成了用于固定的丝状体，束毛蓝细菌属的菌丝体直径约为 6μm。原绿藻、藻类和蓝细菌更详细的内容分别见 12.26 节、14.13 节和 12.25 节。(c) 在亚热带多数海洋沿岸水域中发现的非常微小的藻类（真核生物）*Ostreococcus* 细胞的扫描电镜照片。箭头指的是叶绿体。原绿球蓝细菌和 *Ostreococcus* 细胞的直径约为 0.7μm。

(图 19.12)；反过来，它又可以给更高密度的化能营养细菌和水生动物（如鱼和有壳的水生动物）提供营养物质。有污水或工业废水流入的海湾出现非常多的浮游植物和细菌种群。如果污染相当严重，由于需氧和兼性细菌的呼吸消耗了氧，同时硫酸盐还原细菌（见 19.13 节）产生 H_2S，使得浅海水域实际上变成了无氧环境，对于海洋生物是有害的。

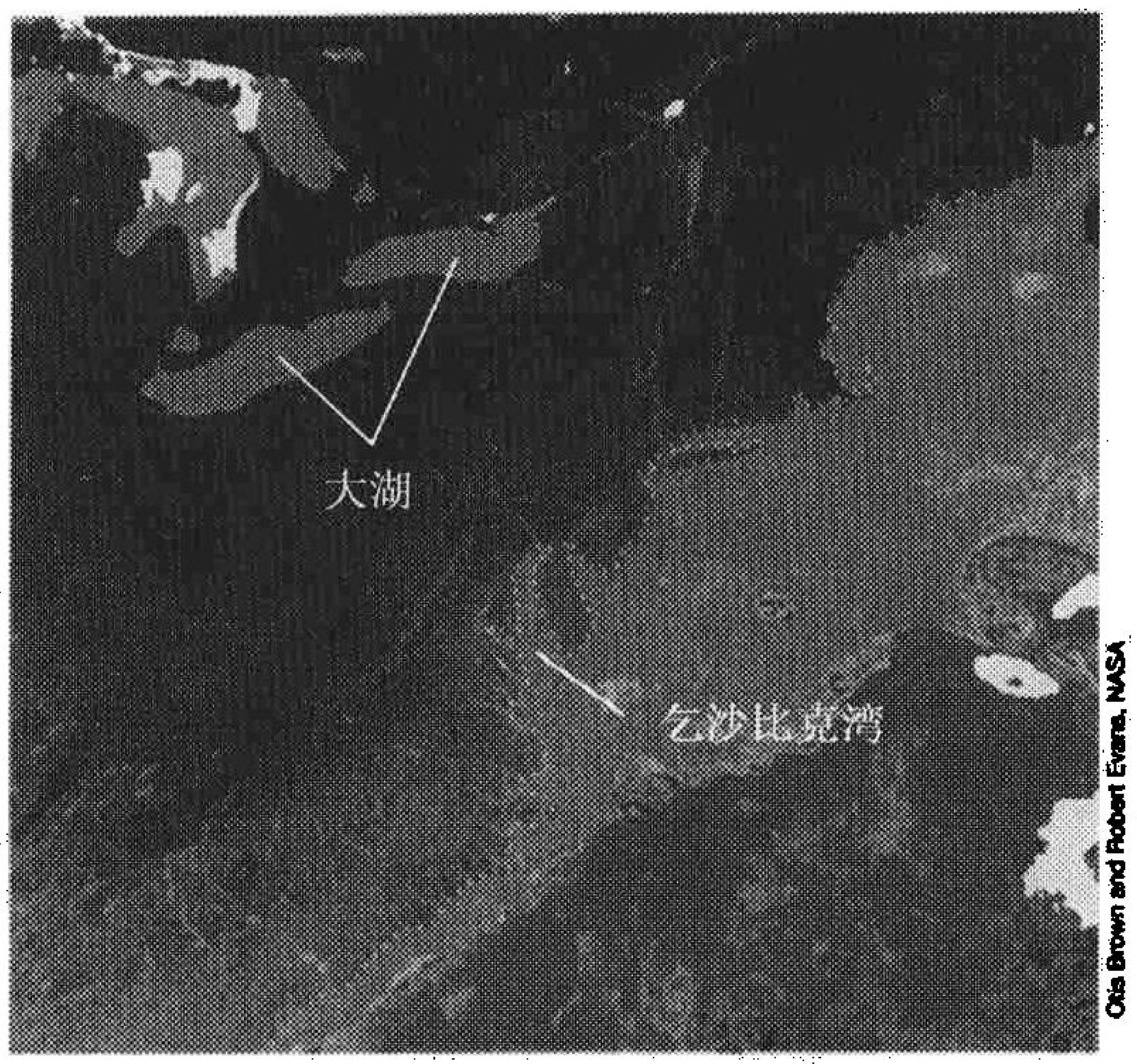


图 19.12 由卫星记录的大西洋西南部叶绿素的分布。点的轮廓表示美国东海岸从佛罗里达州中部到缅因州北部。照片近中心是乞沙比克湾；大湖在左上部。红色显示富含浮游植物的地区叶绿素浓度（>1mg/m³）；蓝色和紫色地区显示低的叶绿素浓度（<0.01mg/m³）。注意沿岸地区和大湖较高的初级生产力。

广阔的海洋微生物学

尽管无机营养和有机碳水平较低，但悬浮在广阔海洋水域的原核细胞数量在 10^5～10^6个/ml，另外，约有 10^4个/ml 非常少量的真核生物存在，这些生物是如何生活的呢？越来越多的证据显示出光驱动的能量代谢是作为维持广阔海洋微生物区系的关键，其中一些微生物，如原绿球蓝细菌属、束毛蓝细菌属和微小的光养真核生物已经讨论过（图 19.11）。

其他光养生物进行不生氧光合作用，但它们不是像典型的紫色和绿色细菌（见 12.2 节和 12.33 节）在无氧条件下进行的那种不生氧光合作用，而是所谓的需氧不生氧光养生物（aerobic anoxygenic phototroph），这种生物仅在有氧条件下进行不生氧光合作用，包括赤细菌属（*Erythrobacter*）、玫瑰杆菌属（*Roseobacter*）和变形细菌（Proteobacteria）属的生物（第 12 章），它们可以完成光合作用并推测利用所产生的 ATP 供给它们的代谢和生长。在海洋水域中这些生物显示了巨大的多样性，特别是在近海区域。贫瘠的淡水湖也出现了需氧的光养生物。

除了这些光养生物外，在海洋透光层（距表层 300m）的许多原核生物含有视色素视紫红质（rhodopsin），细胞利用这种色素将光能转变成 ATP。在 13.3 节中我们已讨论了存在于极端嗜盐菌盐杆菌（*Halobacterium*）（一种古生菌）中研究较为透彻的菌紫红质（bacteriorhodopsin），以及这种分子是如何参与 ATP 合成的。在开阔海洋原核生物中发现的视紫红质形式非常类似于菌紫红质，但它们是系统发育的细菌，而不是古生菌。称为变形菌视紫质（proteorhodopsin），是因为含有它的生物是变形细菌（见 12.1 节），这种分子可能是这些海洋细菌能量代谢的基础，使得细菌不依赖于贫瘠有机碳作为能量来源。

环境基因组学（见 18.6 节）表明编码多种类视紫红质蛋白的基因存在于细菌的许多门，而不存在于广阔海洋中的变形细菌中，因此，这种代谢方式特别在细菌中被广泛应用，并且得到了进化（或通过侧向基因转移获得的），因为在海洋水域中有机或无机电子供体浓度非常低。

古生菌/细菌分布

广阔海洋中原核生物的数量随着深度的增加而降低，正像前面提到的，表面水域平均细胞数量为 $10^5 \sim 10^6$个/ml，但在 1000m 以下时，总细胞数降到 $10^3 \sim 10^5$个/ml。利用系统发育染色鉴别每种系统发育域的细胞（见 18.4 节），发现广阔海洋中细菌和古生菌随深度变化的有趣分布。总的来说，细菌种类在上层水域（＜1000m）占优势，而在下层水域细菌与古生菌数量大约相等或古生菌略占优势（图 19.13），存在于下层水域的古生菌几乎都是古生菌的一个门——泉古生菌门（Crenarchaeota）中的种，包括超嗜热菌（见 13.8～13.11 节）。从图 19.13 数据推测，估计存在于世界海洋中的古生菌和细菌数分别为 1.3×10^{28}个和 3.1×10^{28}个，这说明在地球表面的海洋含有最大的微生物生物量（见 1.3 节）。

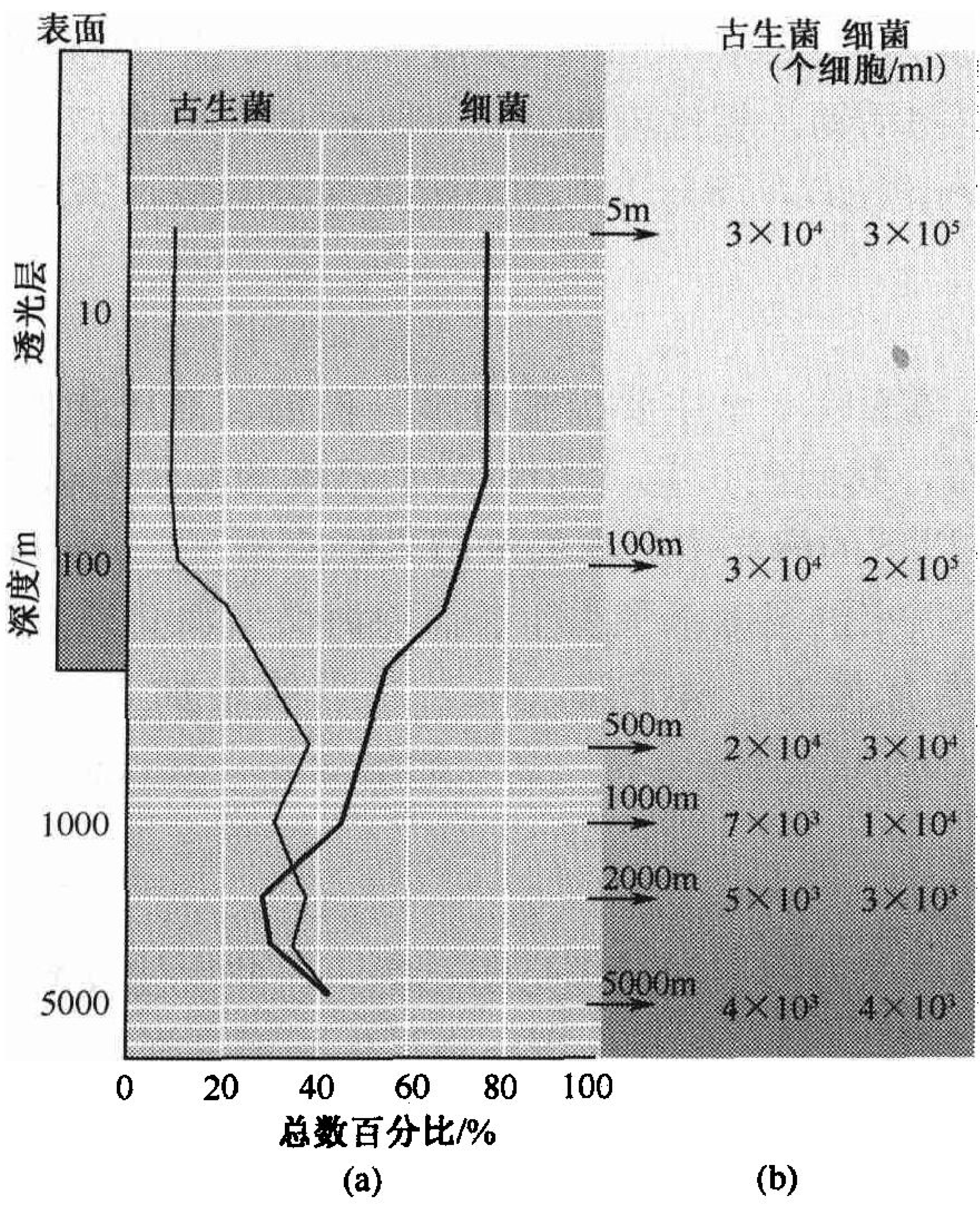


图 19.13　在北太平洋海域属于古生菌或细菌占总原核生物的百分比。（a）不同深度古生菌和细菌的分布。（b）不同深度古生菌和细菌的绝对数量（每毫升）。选自 *Nature* 409：507～510（2000）。

概念检查

海洋水域比许多淡水的营养贫瘠得多，但这里存在着相当数量的微生物，许多生物利用光来驱动 ATP 合成。就原核生物而言，细菌在海洋表面水域占优势，而古生菌在深层水域更具有优势。

◆ 原绿球蓝细菌在海洋的碳和氧循环中是如何起作用的？

◆ 什么是变形菌视紫质？为什么叫这个名字？变形菌视紫质的发现是如何帮助解决如此巨大数量的细菌可以存在于没有必需的可溶性无机物质的广阔海洋水域中的秘密的？

◆ 细菌和古生菌在海洋水域中是如何分布的？

19.7 深海微生物学

可见光不能穿过 300m 以下的广阔海洋水域，这个光照区域称为透光层（photic zone）（图 19.13），透光层以下到 1000m 的深度，由于动物和化能有机营养微生物的作用，仍存在相当多的生物活动。相比较而言，1000m 以下的水域，生物活动相对较少，这就是所说的深海（deep sea），75%以上的海域是深海海域，深度为 1000～6000m。

深海条件

深海中的微生物生境面临 3 个主要极端环境：低温、高压和低营养水平。100m 以下的海洋水温为 2～3℃，我们在 6.10 节中讨论了温度的变化对微生物的影响。正像我们所预料的，从 100m 以下的海洋中分离的细菌是嗜冷菌（psychrophilic，喜冷），某些极端嗜冷菌仅能在一个很窄的温度范围内生长。深海微生物必须能够耐受巨大的静水压力，静水压力是与深度有关的，每下降 10m，压力就增加 1atm（$1atm = 1.01325 \times 10^5 Pa$），因此生长在 5000m 深度的生物，必须能耐受 500atm 的压力。

耐压细菌和嗜压细菌

不同深海原核生物对压力的不同反应是明显的。一些生物仅耐受高压，它们被称为耐压（barotolerant）；相反，另一些在一定压力下生长得最好，这叫嗜压（barophilic）。

从 3000m 深度分离并用于测定其生长或代谢活动随压力变化情况的微生物，通常是耐压的，在耐压生物中，尽管在 1atm 和 300atm 两个压力下其生长速率大约是相同的，但在 1atm 下的代谢速率要比 300atm 下的代谢速率高（图 19.14），然而，分离的耐压菌不能在压力超过 500atm 下生长。相反，从 4000～6000m 深的海洋中取样所得培养物，通常是嗜压的，可在 400atm 压力下最适生长（图 19.14）。尽管嗜压菌在高压下生长最好，但它们在 1atm 下也具有生长能力（图 19.14）。

在更深水域（10 000m）可以发现极端（专性）嗜压菌［extreme（obligate）barophile］，这些生物生长主要需要压力。例如，从马里亚纳群岛（Mariana）海沟（太平洋，深度大于 10 000m）中分离的细菌 *Moritella* 在 700～800atm 下生长最快，在

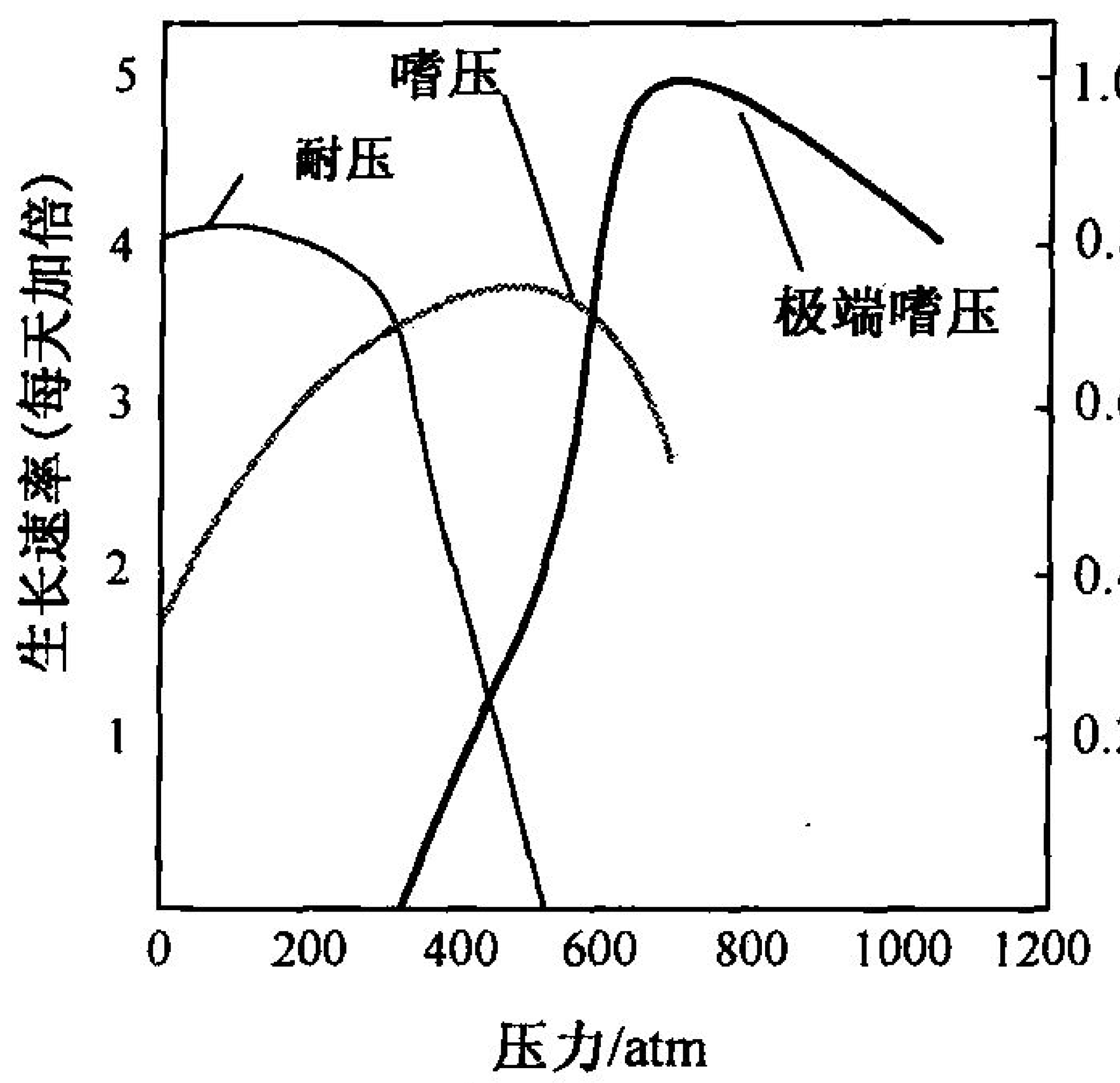


图 19.14　耐压、嗜压和极端嗜压菌的生长。极端嗜压菌 *Moritella* 是从马里亚纳群岛（Mariana）海沟（图 19.15）中分离的。注意极端嗜压菌（右侧纵坐标）比耐压菌和嗜压菌（左侧纵坐标）生长慢得多（在任何压力下），而且在低压下极端嗜压菌不能生长。

1035atm 时也能够生长，压力是在自然生境下形成的（图 19.14 和图 19.15）。但是不同于耐压和嗜压原核生物，*Moritella* 不能在低于 400atm 压力下生长（图 19.14），然而，有趣的是，减压也不会杀死极端嗜压菌，因为它可以耐受一定时期的减压，但在减压情况下培养几个小时后，其生存力会消失。*Moritella* 对温度也是敏感的，其最适生长温度是它的环境温度（2℃），当温度高于 10℃时，其生存力明显地降低。

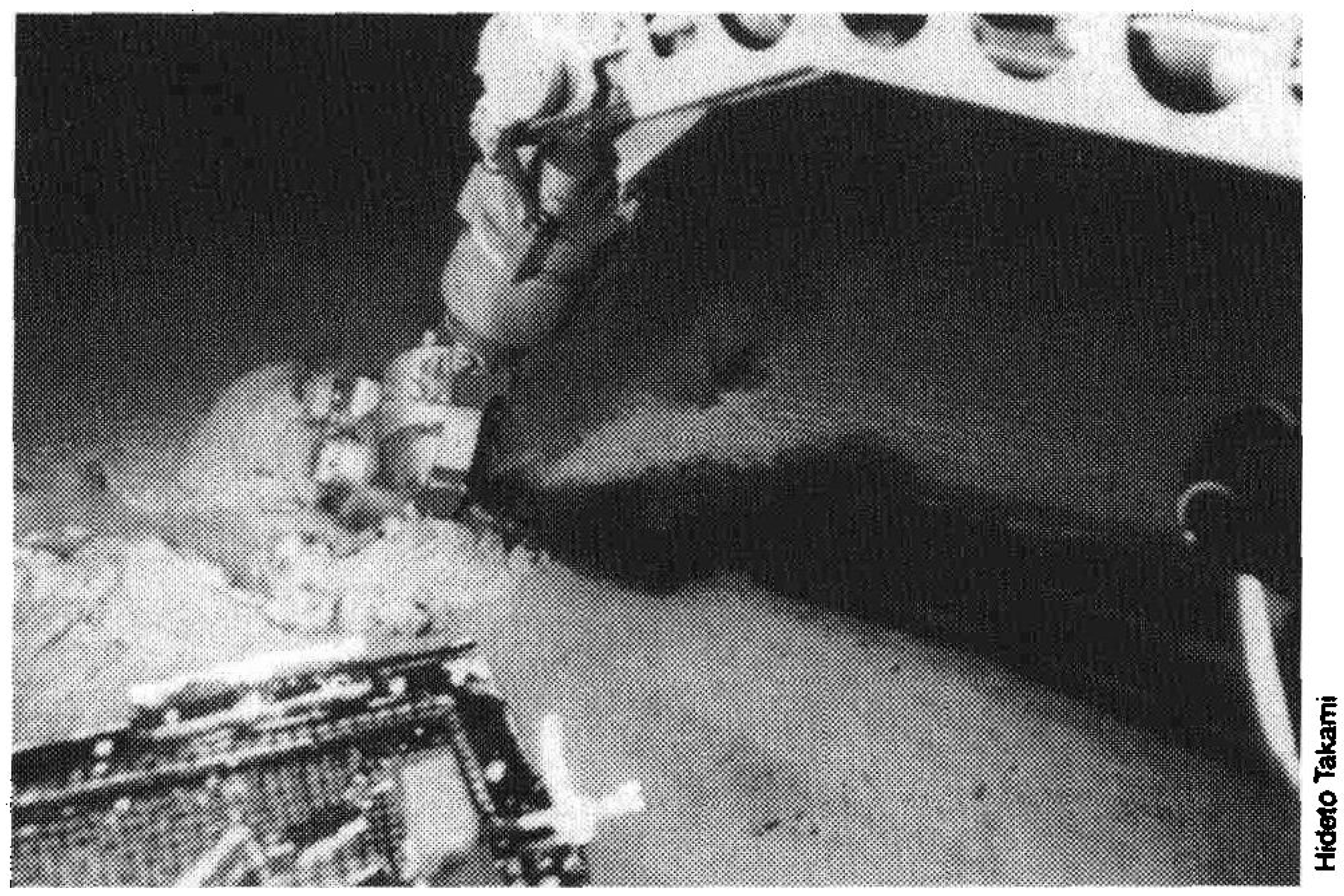


图 19.15　深海取样。无人驾驶并具有潜水能力的 Kaiko 取样臂将取样管插入到深达 10 897m 的马里亚纳群岛海沟（靠近菲律宾的太平洋地区）的海底沉积物中并取样，回收取样管，用于富集和分离嗜压细菌。

高压的分子效应

压力影响细胞的生理学和生物化学，部分原因在于它降低了酶与其底物结合的能力，因此，极端嗜压菌的酶必须折叠起来，以减少与压力相关影响。其他潜在的压

力敏感情况包括蛋白质合成和膜活动（如跨膜运输）。在高压力下生长的生物，其细胞膜上具有较高比例的不饱和脂肪酸，这种变化具有选择性的作用，因为它使细胞膜在高压下可减少凝固。极端嗜压菌如 *Moritella*（图 19.14）生长速率相当慢，可能是由于低温以及压力对细胞生物化学的影响，同时也伴随着反应速率大幅度地降低（图 6.16）。

嗜压菌可以在 500～600atm 下生长（图 19.14）。研究发现在高压下生长伴随着细胞壁蛋白质组分的改变，对某些嗜压菌仔细研究发现，一种叫做 OmpH（外膜蛋白 H）的特殊外膜蛋白（见 4.9 节）在有压力下生长的细胞中合成，而在 1atm 压力下生长的细胞中则不能合成。OmpH 蛋白是孔蛋白的一种类型，孔蛋白是结构蛋白质，形成有机分子穿过外膜进入周质的通道（见 4.9 节和图 4.35b）。假定在低压下生长的嗜压菌细胞中存在的孔蛋白在高压下不能正常发挥功能，那么必须合成一种新类型的孔蛋白。令人惊奇的是，嗜压细菌中只有少数蛋白质是受压力控制的，因为在高压和低压下生长的细胞中许多蛋白质是相同的，细胞壁和相关的结构蛋白以及运输蛋白在应答压力时似乎是变化最大的，说明它们可能是嗜压生活方式的关键。

概念检查

深海是一个高静水压和低营养的寒冷、黑暗的生境。嗜压菌在有压力的条件下生长最好。从海洋最深处分离的极端嗜压菌需在高压下生长。

◆ 压力是如何随着深度而变化的?

◆ 在嗜压菌中发生了何种分子适应，使得它们在有压力下能最适生长?

19.8 热水流火山口

尽管我们认为深海是一个遥远的、低温的、高压的环境，该环境能使耐压和嗜压细菌得以缓慢生长。但还有些令人吃惊的特殊情况，由微生物活动支持的密度较高的旺盛的动物群落，以群生方式遍布于全世界深海水域的温泉中。在地质学上，这些温泉与海底扩散中心（裂缝）有关，在这个区域，热的玄武岩和岩浆非常接近海底，造成海底缓慢的分隔，渗进这些有裂缝区域的海水与热矿质混合，并且从温泉中喷出（图 19.16），这些海底温泉被称为热水流火山口（hydrothermal vent）。

已发现两种主要的火山口类型，温火山口喷发温度为 6～23℃的热水流（进入 2℃的海水），热火山口，通常指“黑烟”（black smoker），也就是热的海水混有富含矿物质的沉积物形成的黑云，喷发出 270～380℃的热水流（图 19.16，图 19.19），温火口喷发出的流速为 0.5～2cm/s，而热火山口流速较高，为 1～2m/s。

生活在热水流火山口的动物

利用小的封闭的潜水艇可以进入热水流火山口并研究生物与它们的关系，繁茂的无脊椎动物群落存在于热水流火山口附近，包括 2m 长的管虫和大量的巨大蛤类和贝类（图 19.17）。考虑到深海的其他地方生物是如此的不丰富，那么那些密集的动物群落在

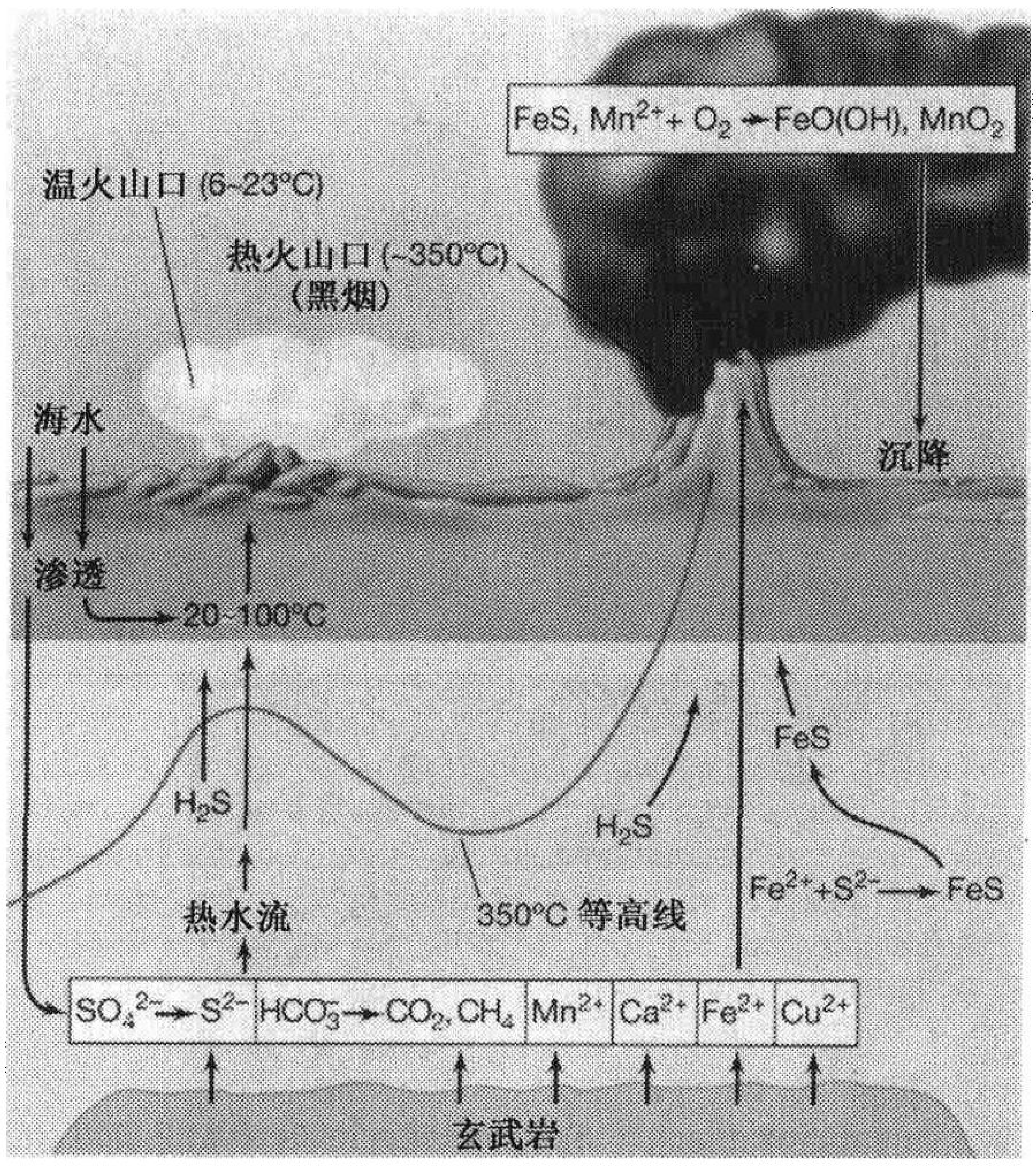


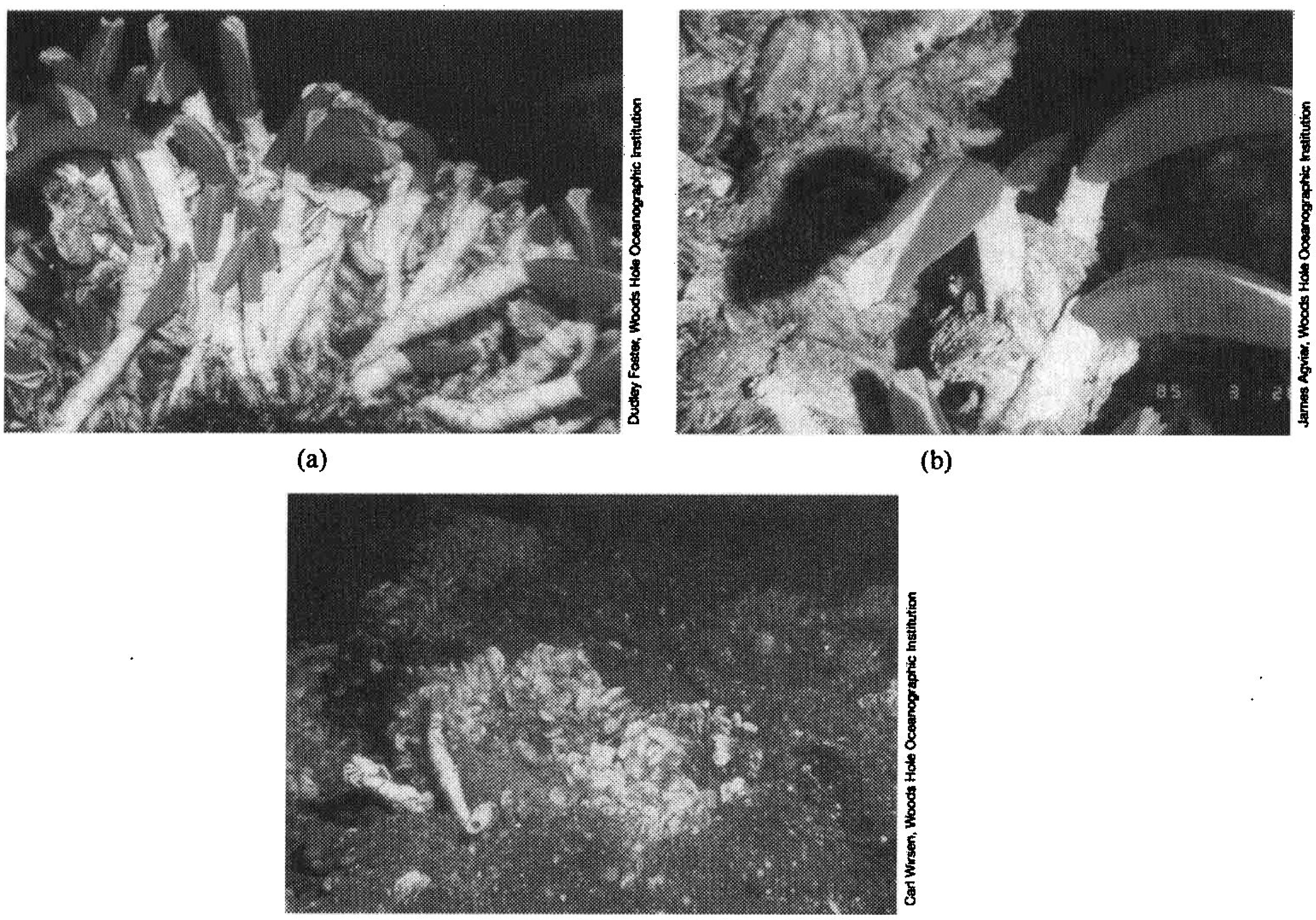
图 19.16　深海温泉：热水流火山口。发生在温火山口和黑烟的地质建造及主要化学种类的示意图。在温火山口（图 19.17），热水流由渗出沉积物的冷海水（2～3℃）来冷却，而在黑烟处（图 19.19），热水流接近 350℃直接到达海底。温火山口和黑烟都在 2000m 的海底发现，人们可以利用像 Alvin 这种小型潜水装置来探险到这个深度，使用者是伍兹霍尔海洋地理研究所（Woods Hole Oceanographic Institution，Woods Hole，MA）的研究员。

缺乏光合作用主要生产者的条件下是如何生存的呢？它们的能量来源是什么呢？

对热水流的化学分析显示出有大量还原的无机物，包括 H_2S，Mn^{2+}，H_2 和 CO，有些火山口含有少量 H_2S 和高含量的 NH_4^+，有机物不存在于热水流火山口喷发出的热水流中。可以清楚地发现动物依赖于化能无机营养细菌的活动（见 12.3～12.5 节和 17.8～17.12 节），这些菌的生长是以消耗从火山口喷出的无机能量为生。海水中的 CO_2 大量以 CO_3^{2-} 和 HCO_3^- 方式存在，被化能无机营养菌固定成有机碳，其中一些供给火山口动物。

热水流火山口的微生物

许多硫氧化化能无机营养菌存在于喷发硫化物的火山口及其周围，从这些火山口附近收集的样本中可以培养出硫杆菌属（*Thiobacillus*）、硫微螺菌属（*Thiomicrospira*），发硫菌属（*Thiothrix*）和贝日阿托氏菌属（*Beggiatoa*）中的细菌（见 12.4 节和 17.10 节），并且野外实验显示出这些细菌自然群体可固定 CO_2，氧化 H_2S 和 $S_2O_3^{2-}$，一些火山口含有硝化细菌、氢氧化细菌、铁和锰氧化细菌或甲基营养细菌，后者推测以火山口喷发的甲烷和一氧化碳（CO）来进行生长（第 12 章讨论了这些生理群）。表 19.2 总结了可能对热水流火山口动物生态学起作用的化能无机营养菌电子供体和电子受体。



(a) (b) (c)

图 19.17 接近深海热火山口生境中的无脊椎动物。(a) 管虫（须腕动物科），显示的是虫体的尾鞘（白色）和羽毛（红色）。(b) 显示管虫羽毛的近距离照片，羽毛从热水流火山口富集营养，特别包括 H_2S，后者被运输给生活在虫体内共生的硫氧化细菌，见文中详细描述。(c) 温火山口附近的贝类床体，注意黄色为贝类上及周围沉积的元素硫（来自于化能无机营养共生体氧化 H_2S）。见表 19.2 所列出的在热水流火山口附近发现的化能无机营养的原核生物。某些火山口动物可能依赖硝化细菌（见 12.3 节和 17.12 节）和甲基营养菌（见 12.6 节和 17.24 节）作为它们的营养。

表 19.2 化能无机营养原核生物对热水流火山口主要生产力的潜在意义[a]

化能无机营养	电子供体	电子受体	供体的产物
硫氧化	HS^-、S^0、$S_2O_3^{2-}$	O_2、NO_3^-	S^0、SO_4^{2-}
硝化	NH_4^+、NO_2^-	O_2	NO_2^-、NO_3^-
硫酸盐	H_2	S^0、SO_4^{2-}	H_2S
产甲烷	H_2	CO_2	CH_4
氢氧化	H_2	O_2、NO_3^-	H_2O
铁和锰氧化	Fe^{2+}、Mn^{2+}	O_2	Fe^{3+}、Mn^{4+}
甲基营养[b]	CH_4、CO	O_2	CO_2

a. 见 12.3～12.5 节和 17.8～17.12 节有关化能无机营养菌的讨论。
b. 见 12.6 节和 17.24 节有关甲基营养的讨论。

在热水流火山口附近生活的动物的营养

发现多种化能无机营养菌与热火山口的动物共生生活，例如，2m 长的管虫（图

19.17）没有嘴、内脏和肛门，但含有一个改进的胃肠道，是由称为营养体（trophosome）的海绵组织组成的，这种海绵组织约占管虫体重的一半，充满了硫颗粒和大量原核细胞（图19.18），平均每克营养组织含3.7×10^9个细胞，这些大的球形细胞在结构上类似于海洋硫氧化细菌卵硫菌属（*Thiovulum*），细菌细胞也显示了核酮糖二磷酸羧化酶（RubisCO）和其他卡尔文循环酶的活性，多数自养型生物通过该途径固定CO_2成为细胞物质（见17.6节）。

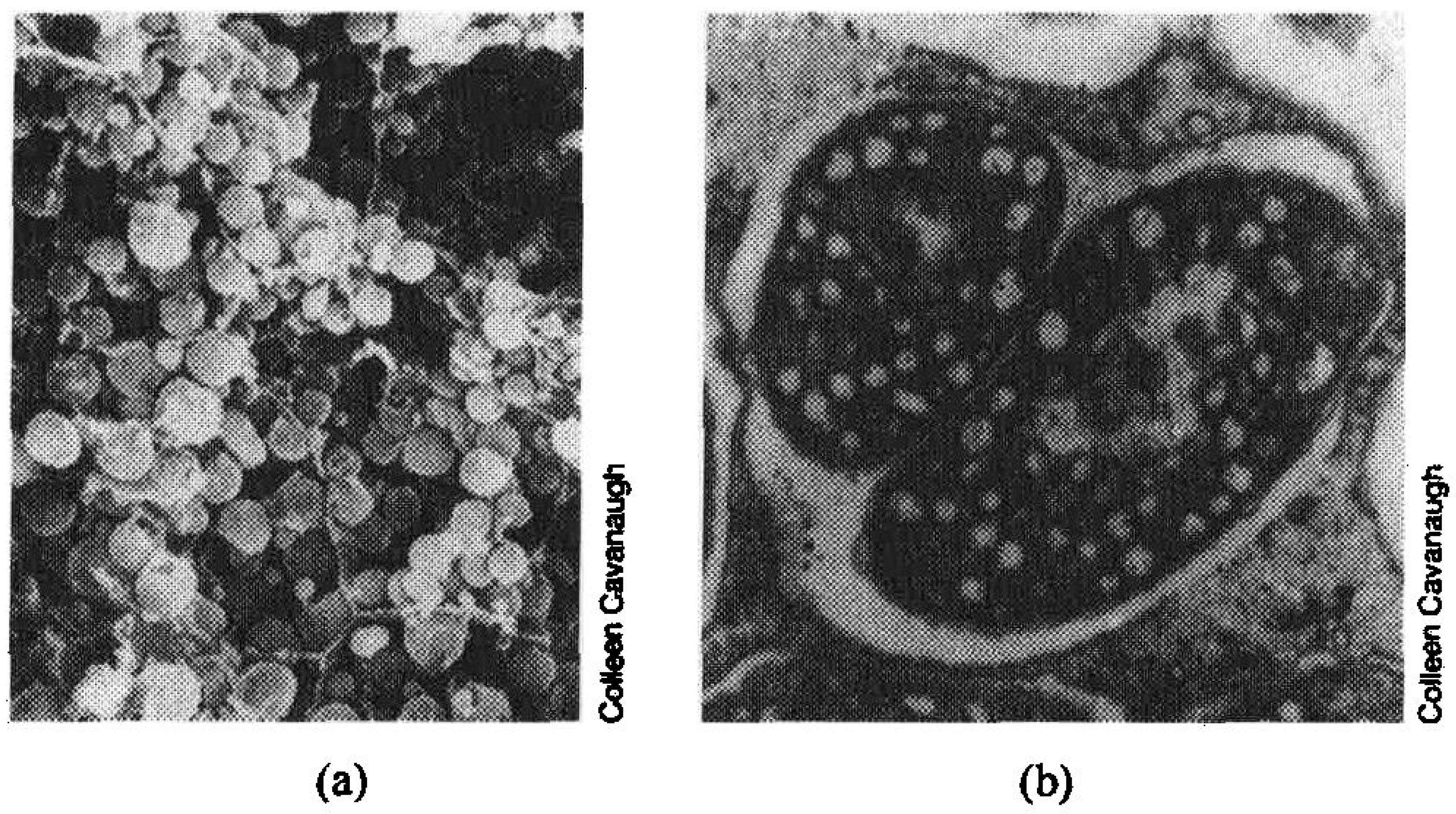


图19.18 热水流火山口管虫中化能无机营养硫氧化细菌与管虫营养体组织的关系。（a）营养体组织的扫描电镜照片显示出球形的化能无机营养硫氧化细菌，细胞直径为3～5μm。（b）营养体组织切片中细菌的透射电子显微照片。细胞通常由成对的未知来源的外层膜所包围。化能无机营养硫细菌已在12.4节、17.8节和17.10节中讨论。经允许翻印自*Science* 213：340～342（1981），©AAAS。

因此，化能无机营养细菌提供管虫营养，动物以化能无机营养共生体的分泌物和死的细胞为生。管虫明亮的红色羽毛（图19.17b）富含血管，并作为O_2和H_2S（见下一段）的捕获器，运输化能无机营养菌到营养体中。巨大的蛤和贝类（图19.17c）也存在于火山口周围，并且同样发现了硫氧化细菌，它们位于这些动物的鳃组织内。系统发育分析（第11章）显示出每个火山口动物一种主要的细菌共生体种群，并且在不同动物类型中，这种细菌种群是不一样的。

管虫含有结合H_2S以及O_2的独特血红蛋白，它们运输这两种基质到营养体，在此释放给细菌共生体。捕获和运输硫化物对于阻碍H_2S毒害动物是必需的，管虫血液中的CO_2浓度很高，某些达到2～30mmol/L，释放到营养体中作为共生生物的碳源。另外，对细菌共生体中元素硫进行稳定性同位素分析（见18.8节）发现细菌的$^{34}S/^{32}S$同位素组成与从火山口喷发出的硫化物组成相同，这个比率不同于海水硫酸盐，另外也证明地热硫化物实际正在进入虫体中。

其他海洋动物可能也依赖化能无机营养菌作为它们的营养。例如，当天然气渗到墨西哥湾相对浅的地方附近时（图12.16），甲基营养共生体对与巨大蛤类以共生关系生活在一起的动物起着营养作用，尽管这些菌不是真正的自养生物（甲烷是一种有机化合物），但这些共生体支持动物的生长，在该过程中氧化甲烷作为能量来源。

超热水：黑烟

深海的一定深度可产生巨大的静水压力。例如，在2600m的深度，当温度达到

450℃时，水才能沸腾；在温度为 350℃时，某一火山口位置超热的热水流才可喷发（图 19.16），这种超热但不沸腾的热水理论上可能是超嗜热细菌的生境（见 6.10 节和 6.12 节，第 13 章）。这种热水流喷发出的黑烟含有大量的金属硫化物，特别是硫化铁，当它与冷的海水混合后迅速冷却，沉淀的金属硫化物形成一个塔，也称为“烟囱”（图 19.19）。

尽管已经清楚原核生物不是生活在真正超热的热水流中，但嗜热和超嗜热细菌生活在海水或由热水与冷海水混合形成的热水流梯度中。例如，烟囱壁上有超嗜热生物如甲烷火菌属（*Methanopyrus*），它是可以氧化 H_2，并产生甲烷（CH_4）的生物（见 13.4 和 13.6 节）。利用荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization，FISH）技术（见 18.4 节）检测了烟囱壁上细菌和古生菌细胞（图 19.20），多数是嗜热的火叶菌属（*Pyrolobus*）和热网菌属（*Pyrodictium*）（见 13.10～13.13 节）。

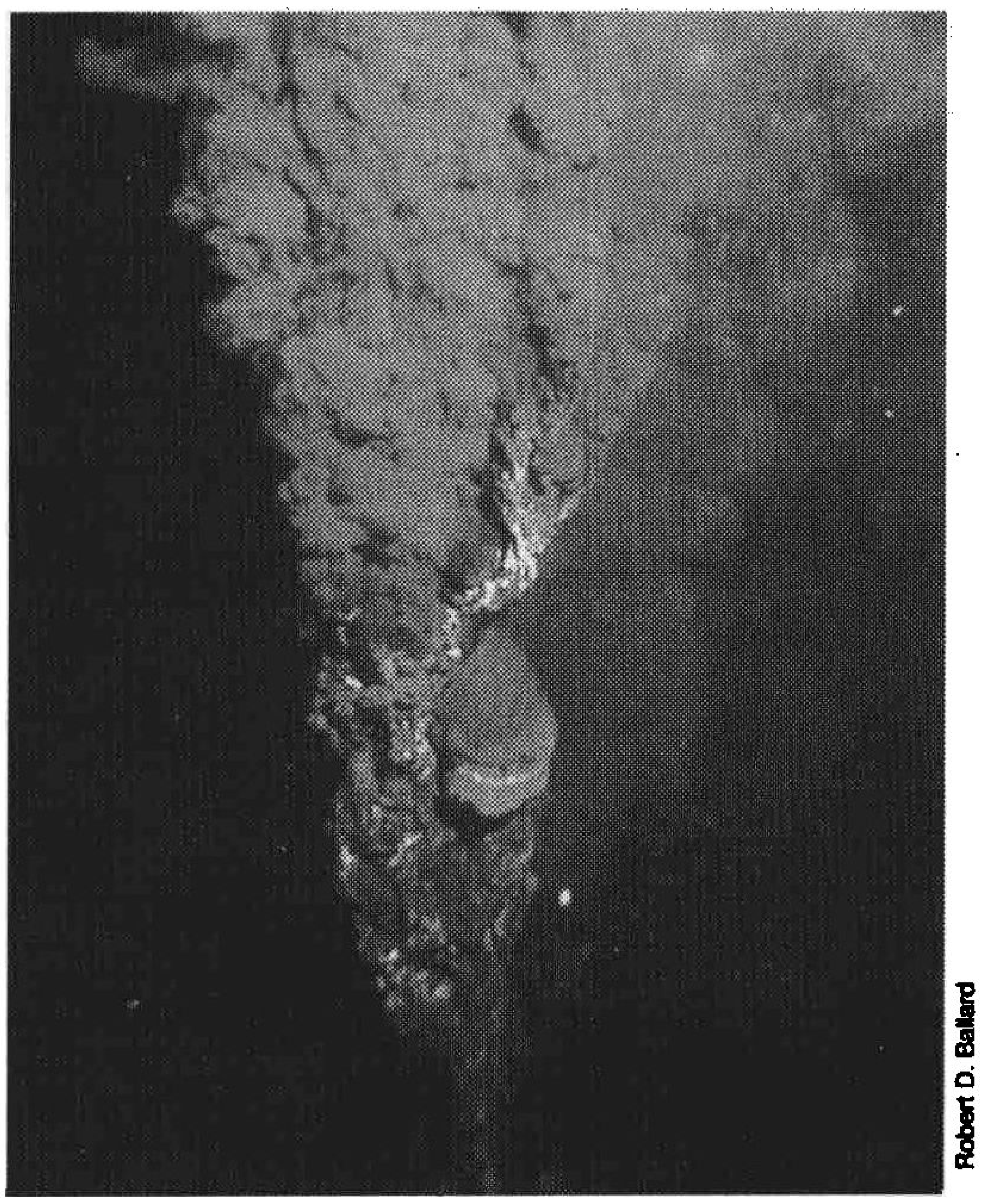


图 19.19 温度为 350℃时，热水流火山口黑烟喷发出的富含硫化物和矿质的水。黑烟囱的壁显示一个温度急剧变化的梯度，并含有几种类型的原核生物（图 19.20）。

当黑烟中的矿物质碎片堵塞时，超嗜热菌可能会漂移走，定居在新形成的黑烟，整合到正在形成的烟囱壁上。令人吃惊的是，尽管超嗜热菌的生长需要非常高的温度，但它可以耐受寒冷的温度和氧气，因此，从一个热的部分到另一个寒冷有氧海水的细胞运输是没有问题的。

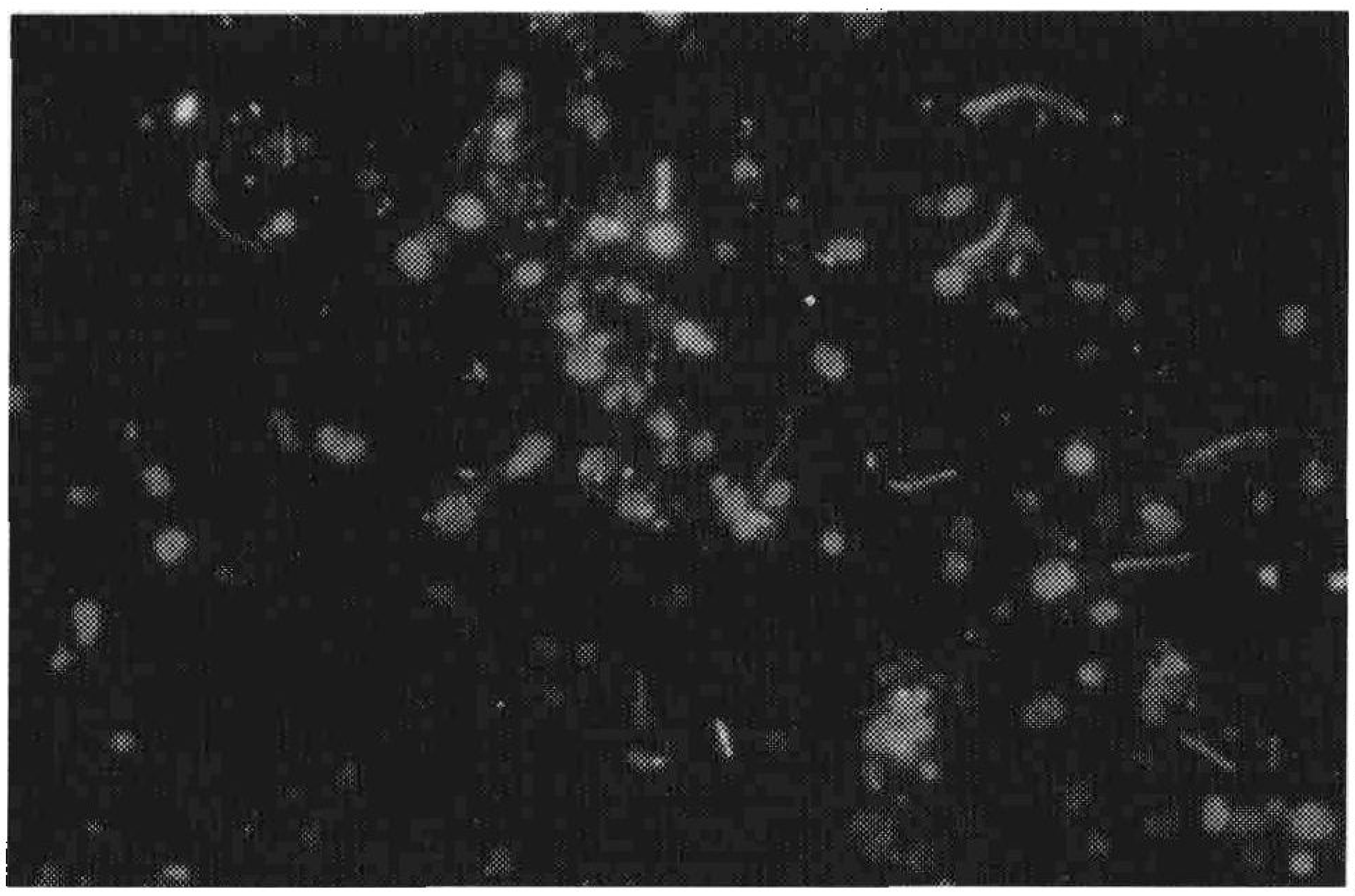


图19.20　大西洋中部蛇坑火山口地区（深3500m）黑烟中物质的系统发育染色。绿色荧光染料与探针结合，可以与所有细菌16S rRNA反应，红色染料与古生菌的16S rRNA反应（见11.7节和18.4节）。烟囱壁外部区域（接近2℃海水）细菌数最高，内部区域最低。通过烟囱中心的热水流达300℃，这种水是无菌的。目前认为微生物存在的温度可达150℃，高于该温度时，生命的主要生物分子是不稳定的（见13.12节）。

概念检查

热水流火山口是深海热泉火山活动导致的热水流，它含有大量的无机能量可供给化能无机营养细菌利用，后者固定CO_2为有机碳，其中的一部分可被深海动物利用。深海热水流火山口是初级生产者化能无机营养细菌的生境，而不是光合营养细菌的生境。

- 热的热水流火山口和黑烟在化学上和物理上有什么不同？
- 巨大的管虫是如何获得营养的？
- 为什么从黑烟喷出的350℃水不沸腾？

Ⅳ　碳和氧循环

地球碳循环涉及微生物和大型生物的活动，并且与氧循环有密切的联系。由于人类活动进入到大气中的CO_2加速，长期以来，碳循环已经是科学研究的热点课题。科学家研究碳循环是为了更好地理解巨大的碳库，主要是CO_2库，和区域内及区域间的循环速率，目的是建立碳转化模型，防止类似于严重的全球性变暖的星际灾难。

19.9　碳循环

从全球的观点来看，碳是在所有地球主要碳库间循环的，这些库包括空气、陆地、海洋和其他水环境、沉积物和岩石，以及生物群（图19.21）。正如我们已经在水生环

境中所看到的，碳和氧循环是密切联系的，如同土壤与地球上其他环境的关系一样。

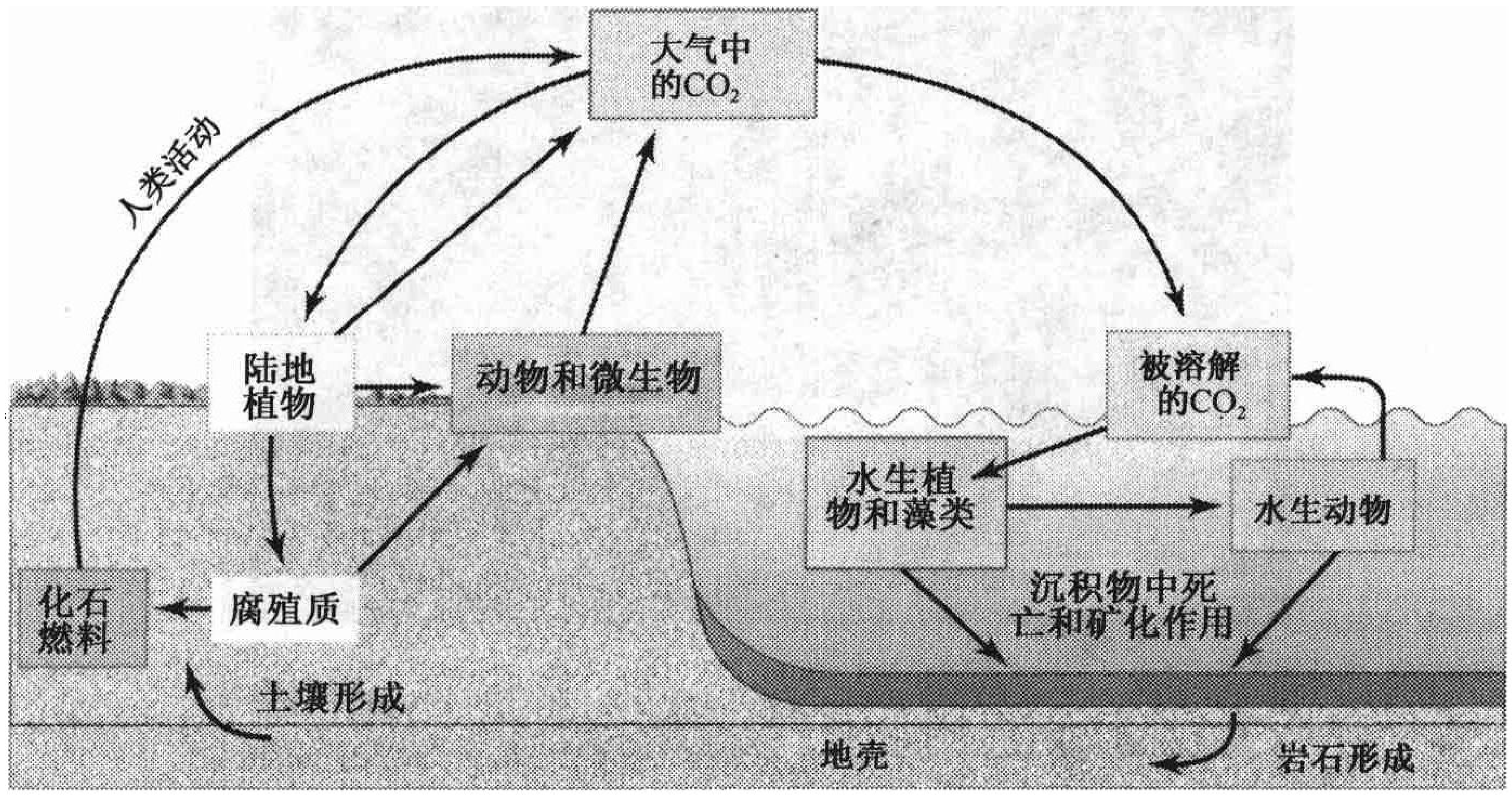


图 19.21 碳循环。碳和氧循环是紧密相连的，有氧光合作用消耗 CO_2，产生 O_2，而呼吸过程是产生 CO_2，消耗 O_2（见 19.5 节）。深层碳循环与地球表面的碳循环可能是同等重要的（见知识窗，地下深层微生物的生活），但是无可靠的证据。地球上多数原核生物被认为存在于陆地和海洋深层（见 1.3 节和 19.4 节）。

碳库

最大的碳库存在于地壳的沉积物和岩石中（表 19.3），但由于流动时间很长，以至于这些流动是很不明显的。从活生物体观点来讲，在陆地植物中发现了大量的有机碳，这个代表了森林和草地的碳也构成了光合作用固定 CO_2 的主要场所，然而，更多的碳存在于死的有机物中，称为腐殖质（humus），而不存在于活的生物体内。

表 19.3 地球上主要的碳库

库	碳/10 亿吨[a]	占地球总碳量的百分比/%
海洋	38×10^3（>95%是无机物 C）	0.05
岩石和沉积物	75×10^6（>80%是无机物 C）	>99.5[b]
陆地生物圈	2×10^3	0.003
水生生物圈	1～2	0.000 002
化石燃料	4.2×10^3	0.006
甲烷化合物	10^4	0.014

a. 数据来自于 *Science* 290：291～295（2000）。
b. 许多有机碳是在原核细胞中。

腐殖质是一个复杂的有机物混合体，一部分来自于土壤微生物的抗分解的原生质成分，一部分来自于抗性植物。有些腐殖质相当稳定，需要约 40 年的时间才能分解，而有些腐殖质的分解要快得多。

地球上最快速的碳转移方式是大气中的 CO_2，主要是通过陆地植物的光合作用消耗大气中的 CO_2，然后 CO_2 又通过动物和化能有机营养微生物的呼吸作用回到大气中，通

过分析各种过程说明，微生物对死的有机物（包括腐殖质）的分解作用是使 CO_2 回到大气中唯一的最主要的贡献。可是，最近人类活动将 CO_2 极大地添加到大气的 CO_2 库中，仅过去的 40 年，大气中的 CO_2 水平就提高了近 14%。

光合作用在碳循环中的重要性

地球上合成新的有机碳唯一主要的方式是光合作用和化能合成（由化能自养菌固定 CO_2），但多数有机碳来源于光合作用。因此，光养生物是碳循环的基础（图 19.21）。自然界中发现的光养生物都是需要光的，因此深海或其他永久黑暗的生境缺乏天然的光养生物。

生氧光养生物可以分为两个主要类群：高等植物和微生物。高等植物是陆地环境中主要的光养生物，而光养微生物是水生环境中最主要的光合作用系统。

碳的氧化还原循环（图 19.22）起始于光合作用：

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{光}} (CH_2O) + O_2$$

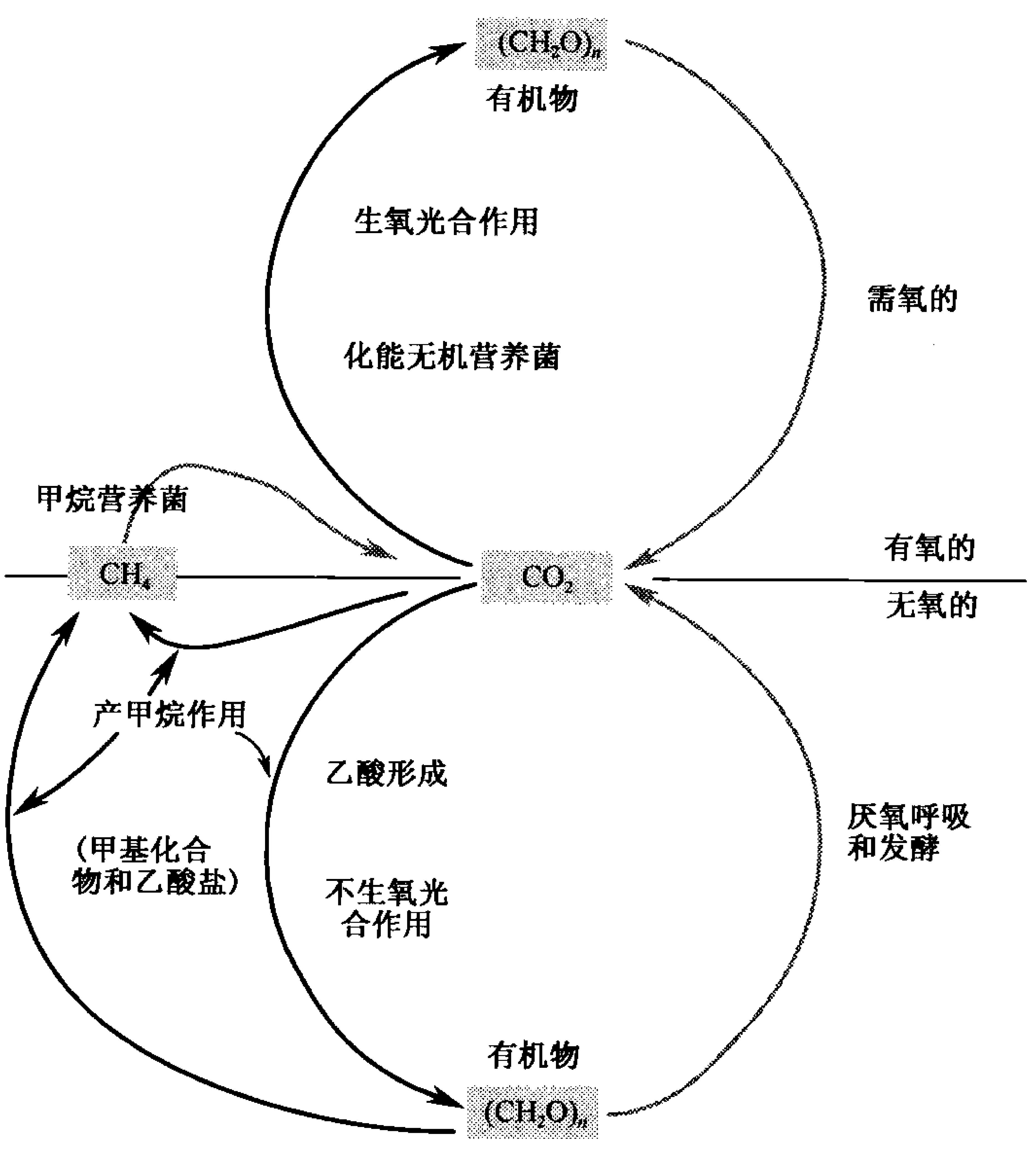


图 19.22　碳的氧化还原循环。图比较了自养（CO_2→有机化合物）和异养（有机化合物→CO_2）过程。黄色箭头显示氧化作用；红色箭头显示还原作用。

这里（CH_2O）代表细胞氧化作用形成的有机物，如多糖（是细胞中储存光合作用的有机物的主要形式）。光养生物在有光和黑暗条件下都可进行呼吸作用，呼吸作用的

总反应是生氧光合作用的逆反应：

$$(CH_2O) + O_2 \xrightarrow[\text{光或黑暗}]{} CO_2 + H_2O$$

这里（CH_2O）代表储存的多糖，如果光养生物为了增加细胞数或量，那么光合作用速率必然大于呼吸作用速率，如果生长发生，一些由 CO_2 固定成多糖的碳可作为生物合成的起始物质，整个碳循环是建立在一个光合作用速率大于呼吸作用速率的正平衡上。

分解作用

光合作用固定的碳最终被微生物生物所降解，形成两种主要碳：甲烷（CH_4）和二氧化碳（CO_2）（图 19.22）。这两种气体产物是由产甲烷菌（CH_4）或化能有机营养菌通过发酵、无氧呼吸或有氧呼吸（CO_2）形成的。无氧生境中 CH_4 的产生来自于由 H_2 还原的 CO_2 和像乙酸这类的某些有机化合物。但是，实际上任何有机化合物最终被互养细菌和产甲烷菌结合的生命活动转化成 CH_4。有机化合物发酵分解产生的 H_2 被产甲烷菌消耗，并转化成 CH_4（见 17.17 节和下一节）。无氧生境产生的 CH_4 是不溶性的，被运输到有氧环境时，产甲烷菌就将其氧化成 CO_2（图 19.22），然后，所有的有机碳最终回到 CO_2，碳循环完成。

碳循环中氧化部分和还原部分的平衡是关键，某些生物的代谢产物是其他生物的底物，因此，碳循环需要保持平衡，如果这种状况持续下去，它可以维持几十亿年。气体形式的碳在任何水平上的明显改变将带来全球严重的后果（正如我们正在经历的全球变暖是由于砍伐森林和化石燃烧引起的大气中 CO_2 水平的增加）。关于分解作用，由微生物活动释放的 CO_2 远远超过了真核生物，尤其是在无氧环境中，我们将在下面讨论。

概念检查

在自养和异养生物互补活动中氧循环和碳循环是相互联系的，微生物分解作用是 CO_2 释放到大气中唯一最大的来源。

◆ 自然界中，新的有机物是如何产生的？

◆ 生氧光合作用和呼吸作用是以什么方式相连的？

19.10 互养共栖和产甲烷作用

来自生物产甲烷作用的甲烷是许多无氧生境中非常重要的碳流。产甲烷作用（methanogenesis）是由古生菌群——产甲烷菌来实现的，它们是严格的厌氧菌，我们在 17.17 节中讨论了产甲烷作用的生物化学，在 13.4 节中讨论了产甲烷菌。大多数产甲烷菌在厌氧呼吸中利用 CO_2 作为它们最终的电子受体，用 H_2 把它还原成甲烷（图 19.22）。只有少数以乙酸为主的底物，可以被产甲烷菌直接转化为甲烷。因此，对于大多数有机化合物转化为 CH_4，产甲烷菌必须与提供给它们底物的生物协同合作，这是互养共栖菌的作用。

无氧分解作用和互养共栖

在 17.21 节中我们讨论了互养共栖（syntrophy）的概念，这个过程是两种或更多种生物共同分解某些化合物，同时还讨论了这个过程中的能量学问题。这里我们将介绍互养共栖细菌与其他生物的生态相互作用和它们在无氧碳循环中的重要性，重点是无氧淡水沉积物，那里会发生许多无氧代谢。

多糖、蛋白质和脂肪酸等聚合底物是死生物体的产物，由几种不同生理种群的原核生物协同作用可以将它们转化成 CH_4 和 CO_2。例如，像纤维素这样一个典型的多糖分解（图 19.23 和表 19.4），该过程首先由分解纤维素细菌将纤维素分子分解为纤维二糖（葡萄糖-葡萄糖），然后将其继续分解为游离的葡萄糖，葡萄糖通过初级发酵者产生各

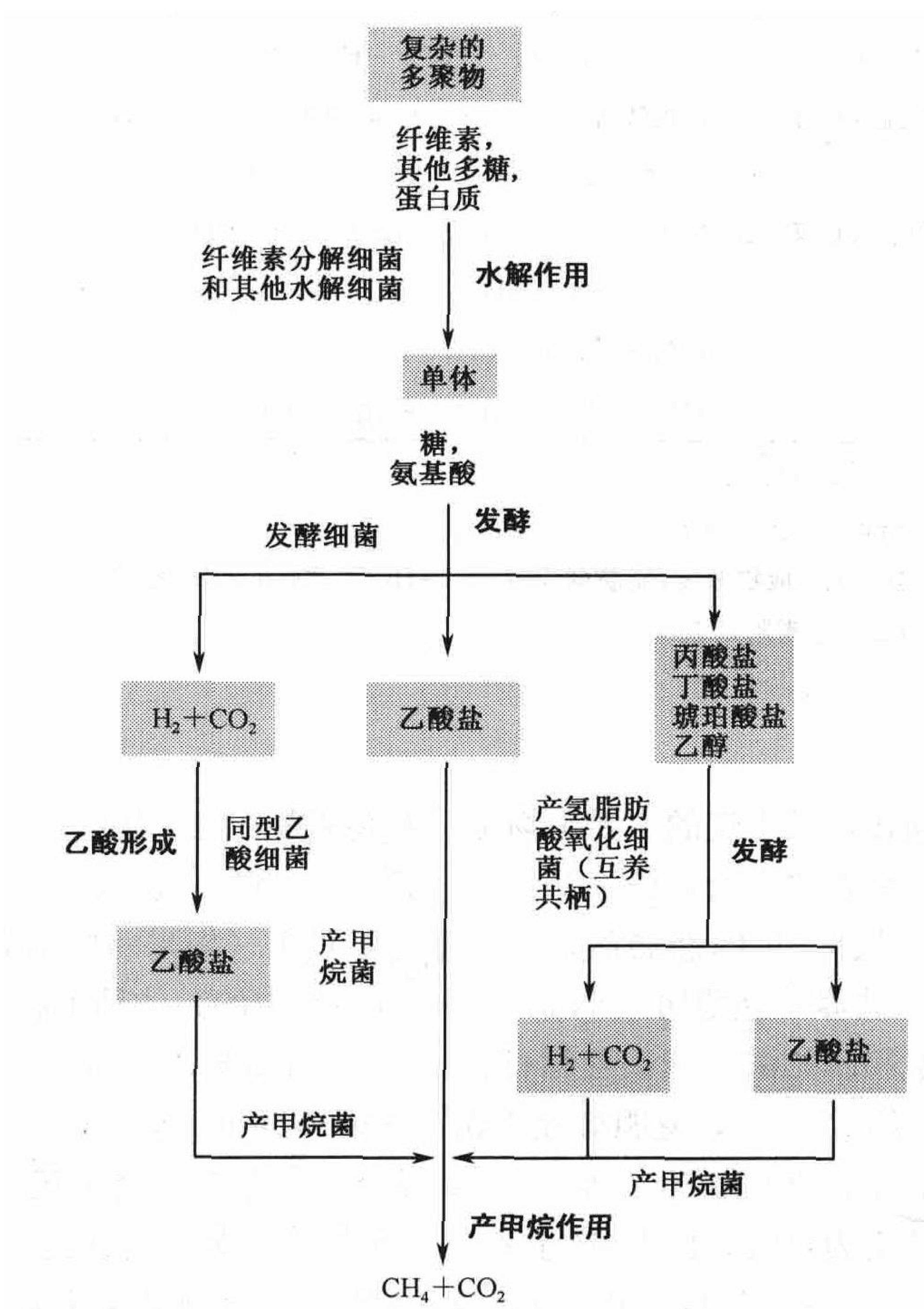


图 19.23　无氧分解作用。显示的是无氧分解作用的全过程，不同种群的发酵厌氧细菌共同作用使复杂的有机物质最终转变为甲烷（CH_4）和 CO_2。乙酸和 H_2 加上初级发酵产生的 CO_2 可以被直接转化成 CH_4，尽管 H_2 + CO_2 也可以被同型乙酸细菌所消耗。通过互养共栖菌的活动，脂肪酸和乙醇被转化成产甲烷作用和乙酸形成的底物。该图显示环境中硫酸盐细菌仅起到较小的作用，这些环境如淡水湖沉积物、污泥生物反应器或瘤胃。

种发酵产物，包括乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、琥珀酸、乙醇、H_2和CO_2。初级发酵产生的H_2可以被H_2消费者除去，如产甲烷菌、同型乙酸细菌或硫酸盐还原细菌（或者存在于含有硫酸盐较高水平的环境中）。另外，乙酸可以由某些产甲烷菌转化为甲烷，但它会留下许多像脂肪酸和乙醇这种形式的碳，这些化合物的分解代谢是由互养共栖菌来完成的（图 19.23）。

表 19.4 有机物无氧转变为甲烷的主要反应[a]

反应类型	反应	自由能变化(kJ/反应)	
		$\Delta G^{0'b}$	ΔG^c
葡萄糖发酵生成乙酸盐，H_2和CO_2	葡萄糖$+4H_2O \rightarrow 2$ 乙酸盐$+2HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2$	−207	−319
葡萄糖发酵生成丙酸盐，CO_2和H_2	葡萄糖$+2H_2O \rightarrow$丙酸盐$+2H_2CO_3^- + 2H_2 + 3H^+$	−135	−284
丙酸盐发酵生成乙酸盐和H_2	丙酸盐$+2H_2O \rightarrow$乙酸盐$+H^+ + 2H_2$	+48.2	−17.6
琥珀酸盐发酵生成乙酸盐，CO_2和H_2	琥珀酸盐$+3H_2O \rightarrow$乙酸盐$+HCO_3^- + H^+ + H_2$	+76.2	−5.5
乙醇发酵生成乙酸盐和H_2	2 乙醇$+2H_2O \rightarrow$乙酸盐$+4H_2 + 2H^+$	+19.4	−37
苯甲酸盐发酵生成乙酸盐，CO_2和H_2	苯甲酸盐$+7H_2O \rightarrow 3$ 乙酸盐$+3H^+ + HCO_3 + 3\ H_2$	+70.1	−18
从H_2+CO_2产生甲烷	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	−136	−3.2
从乙酸盐产生甲烷	乙酸盐$+H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	−31	−24.7
从H_2+CO_2形成乙酸	$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow$乙酸$+2H_2O$	−105	−7.1

a. Zinder S. 1984. *Am. Soc. Microbiol. News* 50:294～298。

b. 标准条件：溶质 1mol/L；气体 1atm。

c. 典型无氧淡水生态系统反应物浓度：脂肪酸 1mmol/L；HCO_3^- 20mmol/L；葡萄糖 10μmol/L；CH_4 0.6atm，H_2 10^{-4}atm。从$\Delta G^{0'}$计算得ΔG，参考附录 1。

互养共栖菌的作用

使复杂有机物转化成甲烷的主要生物是互养共栖菌，这些生物是次级发酵者。互养共栖菌发酵初级发酵者的产物，产生H_2和其他产物。例如，沃氏共养单胞菌（*Syntrophomonas wolfei*）氧化C_4-C_8脂肪酸产生乙酸盐、CO_2（如果脂肪酸含有奇数碳原子）和H_2（表 19.4）。共养单胞菌属（*Syntrophomonas*）中的其他种可利用长度达C_{18}脂肪酸，包括某些不饱和脂肪酸。沃氏互营杆菌（*Syntrophobacter wolinii*）专门氧化丙酸盐，产生乙酸盐、CO_2和H_2，龙胆酸互养菌（*Syntrophus gentianae*）降解芳香族化合物苯甲酸酯为乙酸盐、CO_2和H_2（表 19.4）。确实，如果与生物体正确的结合，任何有机化合物都可以转变为甲烷，但H_2产生者——互养共栖菌不能在纯培养中完成互养反应；它们的生长需要消耗H_2的共生生物，这种需要是为了解决互养过程的能量。

正如在 17.21 节中所解释的，由共生生物消耗H_2是互养共栖菌生长所必需的。当表 19.4 中的这些反应以所有反应物在标准条件下（溶质 1mol/L，气体 1atm）计算时，反应产生的自由能变化是正值，也就是说，这些反应的$\Delta G^{0'}$（见 5.4 节）不是放能的（表 19.4）。但是共生细菌消耗H_2大大地改变了能量图，可使足够的能量转化来支持互养共栖菌的生长，这可以由表 19.4 看出，如果由于共生生物的活动，H_2浓度保持非常低，则ΔG值（测得的生境实际条件下自由能变化）有利于能量转化，这种代谢配合的

最终产物是 CO_2 和 CH_4。互养分解的底物几乎是无限的，甚至包括饱和烃。

甲烷的无氧代谢

在淡水生态系统中，当在无氧沉积物中产生的甲烷到达有氧区（图 19.22）时，被甲烷营养菌氧化为 CO_2，这些氧化甲烷的原核生物分解甲烷需要 O_2，因为甲烷氧化作用第一步利用单加氧酶（见 17.22 节和 17.24 节及图 17.55 和图 17.58）。但在海洋沉积物的无氧条件下，甲烷也可以被含有某些硫酸盐还原细菌和产甲烷菌的细胞团聚体所氧化（图 19.24a）。

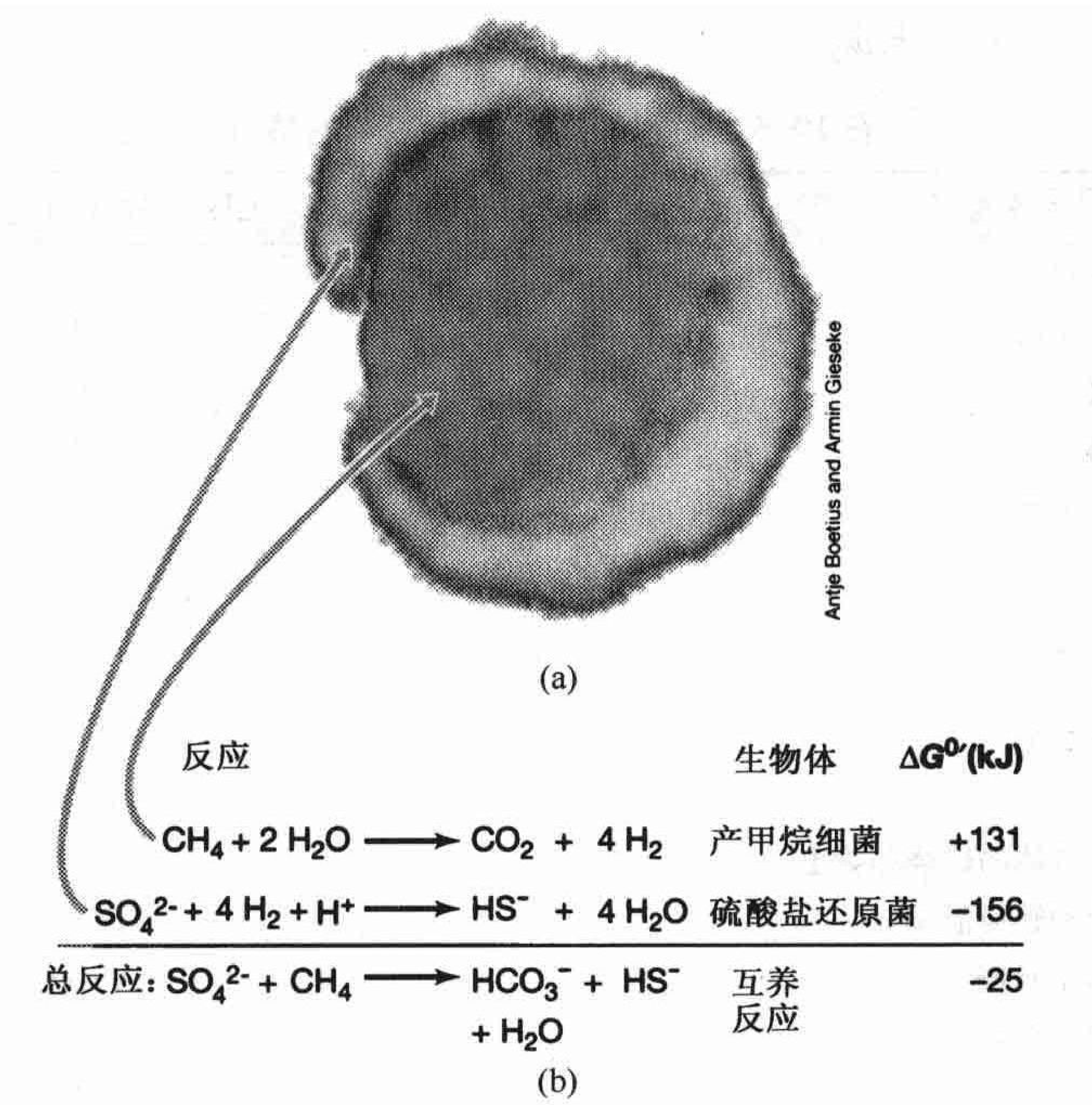


图 19.24 无氧的甲烷氧化作用。（a）来自海洋沉积物的氧化甲烷的细胞团聚体。团聚体含有由硫酸盐还原细菌（绿色）包裹的产甲烷细菌（红色），每种细胞类型被不同的系统发育的荧光原位杂交染色法所染色（见 18.4 节）。团聚体直径约为 30μm。（b）细胞团聚体中可能的互养无氧的甲烷氧化机制。

甲烷是如何被团聚体氧化还不清楚，但提出了两种方式。一种是产甲烷菌通过产甲烷作用的相反步骤氧化甲烷为 CO_2（见 17.17 节及图 19.24b），这种反应不利于能量产生，除非产生的 H_2 被代谢互养型的次级生物去除，这是硫酸盐还原菌的作用，消耗 H_2 产生 H_2S（图 19.24），产生非常少的能量（图 19.24b），并且团聚体组分之间能量是如何分配的还不清楚。

另一种是产甲烷的菌可将甲烷转化成乙酸，同时硫酸盐还原细菌通过硫酸盐还原作用将乙酸氧化成 CO_2。无论这种合作关系是如何作用的，无氧甲烷氧化作用是明显的一个互养过程，因此两种生物合作完成某一反应，而任何一方不能单独完成。最近，对无氧氧化甲烷的细胞团聚体的环境基因组分析支持了反向产甲烷假说。

甲烷形成的生境

尽管产甲烷菌是专性厌氧生活并进行特殊的代谢方式，但它们在地球上还是普遍存在的，虽然只在缺氧环境中才能发生高水平的甲烷生成过程，如木本沼泽和草本沼泽或瘤胃中（见 19.11 节），但这个过程也可以发生在正常的有氧生境（如森林和草原土壤）中。在缺氧的微环境（如土壤团粒的中部）也可发生产甲烷作用（图 19.2）。表 19.5 显示了不同生境甲烷生成的速率，可以看出生物产生的甲烷超出了由气体和其他非生物来源产生的甲烷量。由反刍动物的嗳气（见 19.11 节）及由白蚁、稻田和天然湿地释放的甲烷是最大的生物甲烷来源。

表 19.5 对甲烷释放到大气中的估计[a]

来源	CH_4释放（10^{12}g/年）
生物起源的	
反刍动物	80～100
白蚁	25～150[b]
稻田	70～120
天然湿地	120～200
填地	5～70
海洋和湖泊	1～20
冻原	1～5
非生物起源的	
煤矿	10～35
天然气体的燃烧和排出	10～30
工业和管道泄漏	15～45
生物质燃烧	10～40
甲烷水合物	2～4
火山	0.5
汽车排放	0.5
总量	350～820
生物起源总量	302～665 占总量的 81%～86%
非生物起源总量	48～155 占总量的 13%～19%

a. 数据取自 Tyler 的预测（Tyler S C，1991）。全球甲烷预算，pp. 7～58，Rogers E J 和 Whitman W B，American Society for Microbiology，Washington，DC。

b. 近期预测显示较低的值可能更精确。

在某些原生动物中也发现了产甲烷菌作为内共生体，几种类型的原生动物包括游离生活的水生变形虫和昆虫消化道中的鞭毛虫都是产甲烷菌的港湾。例如白蚁中，产甲烷菌主要存在于毛滴虫原生动物的细胞中，这种原生动物寄居在白蚁的后肠中（图 19.25），原生动物产甲烷共生体类似于甲烷杆菌属（*Methanobacterium*）或甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*）的棒状种（见 13.4 节），但它们与游离生活的产甲烷菌的确切关系还不清楚。在白蚁后肠中，内共生的产甲烷菌消耗 H_2对它们的原生动物寄主是有利的，这个氢是由分解纤维素的原生动物通过葡萄糖发酵产生的，正像表 19.5 所显示的，白蚁是生物来源的甲烷的主要生物之一。

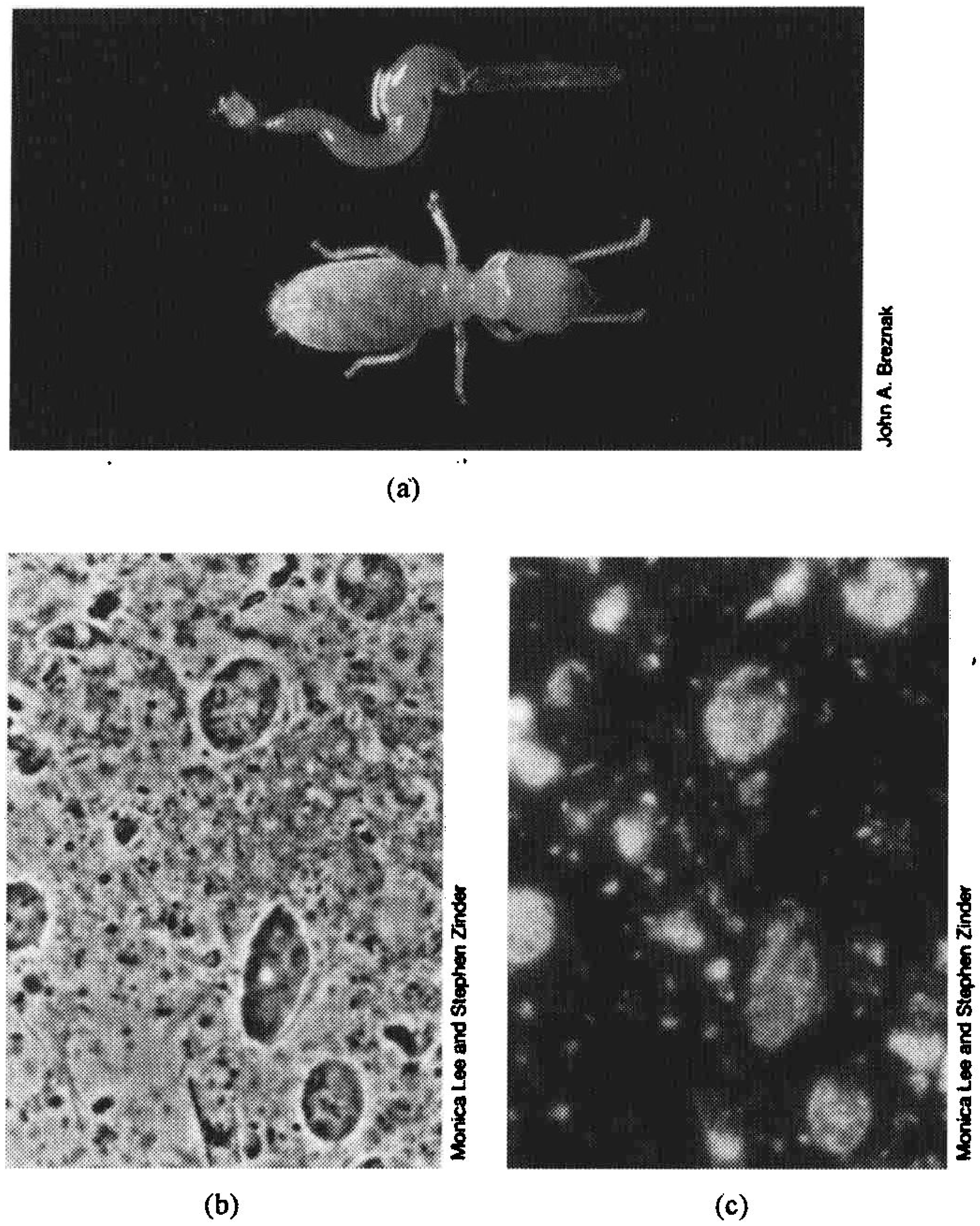


图 19.25　白蚁及其碳代谢。(a) 美国东部一种常见的地下工作白蚁的幼虫显示从工作白蚁中提取的后肠。动物约长 0.5cm。在这些白蚁中尽管也发生甲烷形成作用，但乙酸形成是无氧碳代谢的主要形式。(b, c) 来自于白蚁（*Zootermopsis angusticolis*）后肠中的微生物。用两种不同方法拍摄的同一视野。(b) 相差。(c) 表面荧光，由于高含量的荧光辅酶 F_{420}，所以产甲烷菌显示典型的颜色（见 17.17 节和图 17.42，图 17.43）。产甲烷菌在原生动物 *Tricercomitis* sp. 细胞内，植物粒子为黄色荧光，原生动物细胞的平均直径为 15～20μm。见 4.1 节有关荧光显微镜的讲述。

乙酸形成的生境

与甲烷形成竞争的途径是乙酸形成（acetogenesis）（见 17.16 节）。在一些生境（如瘤胃）中（见 19.11 节），同型乙酸菌相对于产甲烷菌是弱的竞争者，因此产甲烷作用是主要的耗氢过程。但是在另一些生境，如白蚁后肠中也发生产甲烷作用（表 19.5 和图 19.25），但同型乙酸作用是一个更重要的过程。

在白蚁后肠中，什么是控制厌氧代谢的主要形式呢？仅从能量学考虑，由 H_2 进行的产甲烷作用比乙酸形成更有利（分别为－131kJ 和－105kJ），因此产甲烷作用应该具有竞争优势。但是，在白蚁中并不是这样，其中有 3 个原因，每一个原因都是有实验证据支持的。第一，同型乙酸菌能够将它们自己定位在白蚁肠道中比产甲烷菌离 H_2 源更近的位置，消耗来自纤维素发酵产生的大部分的 H_2。第二，不像产甲烷菌，同型乙酸

菌可以发酵葡萄糖（从纤维素获得的）。第三，白蚁吃木材，而木材纤维素中混有高浓度的木质素，这种物质的降解方式有利于乙酸形成。因此，综合白蚁后肠特殊生境中各种因素可能使乙酸形成优于产甲烷作用，这是一种典型的无氧环境情况。

产甲烷作用与硫化物形成

无氧淡水和陆地环境中产甲烷作用和乙酸形成比在海洋沉积物中更为普遍，这是因为海洋沉积物中含有丰富的硫酸盐还原细菌，与产甲烷菌和同型乙酸菌竞争 H_2。这种生物化学基础在于由 H_2 还原硫酸盐的能量学优于由 H_2 还原 CO_2 为 CH_4 或乙酸（见 17.15～17.17 节）；由于一定的生物化学原因，这有利于硫酸盐还原。但是，在淡水中，因为硫酸盐有限，硫化物形成是非常低的，而产甲烷作用和乙酸形成占主要地位。

概念检查

在无氧条件下，有机物质被降解为 CH_4 和 CO_2，许多 CH_4 是由产氢互养细菌提供的 H_2 还原 CO_2 形成的；这些生物依赖于 H_2 消耗以平衡它们的能量，从全球来看，生物起源的甲烷要比非生物起源的甲烷多得多。

- 哪种类型的生物可以与互养单胞菌属共培养而生长？
- 乙酸形成的最终产物是什么？哪种无氧生境显示了乙酸形成大于产甲烷作用？
- 为什么在海洋沉积物中，氢的产甲烷作用不是一个主要过程？
- 在缺氧时，CH_4 是如何被氧化的？

19.11 反刍动物中的碳循环

反刍动物（ruminant）是草食哺乳动物，具有一个特殊的消化器官——瘤胃（rumen）。瘤胃中，纤维素和其他植物性多糖是通过微生物的活动而被消化。一些最重要的家畜如牛、绵羊和山羊都是反刍动物，因为人类的食物经济在很大程度上依赖这些动物，所以瘤胃微生物学具有相当重要的经济意义。

瘤胃的解剖学及其作用

陆生植物中大量的有机物是以不溶性多糖的形式存在，其中纤维素（cellulose）最为重要。哺乳动物和实际上几乎所有的动物都缺乏分解纤维素的酶，但反刍动物可以利用微生物作为消化剂来分解这些纤维素。作为纤维素消化部位的瘤胃具有独特的特点：它有相当大的体积（牛 100～150L，绵羊 6L）；而且其位置在酸性胃前面的消化道内；瘤胃温暖恒定的温度（39℃），恒定的 pH（6.5）和缺氧环境在其功能中也是重要的因素。

图 19.26a 显示的是瘤胃与反刍动物消化系统其他部分的关系。瘤胃中的消化过程和微生物学已经知道得很清楚了，部分原因是可以通过制造一个通往牛（图 19.26b）或羊瘤胃的取样口，称之为瘘管（fistula），并取样分析。食物首先进入网胃（reticulum），并快速泵入瘤胃，在此与含有碳酸氢盐的唾液混合，并且以旋转的方式进行搅

拌，这种蠕动作用把纤维素碾成悬浮液，有助于微生物附着和发酵。然后食物逐渐进入网胃，在此形成一些小的块，称为食团（cud）；这些食团回吐到口中再次咀嚼。这些咀嚼很细的食物与唾液充分混合后，再吞咽下去，此时食物经过瓣胃（omasum），再从这到达皱胃（abomasum），这个器官更类似于真（酸性）胃，在皱胃开始化学消化过程，然后不断进入小肠和大肠。

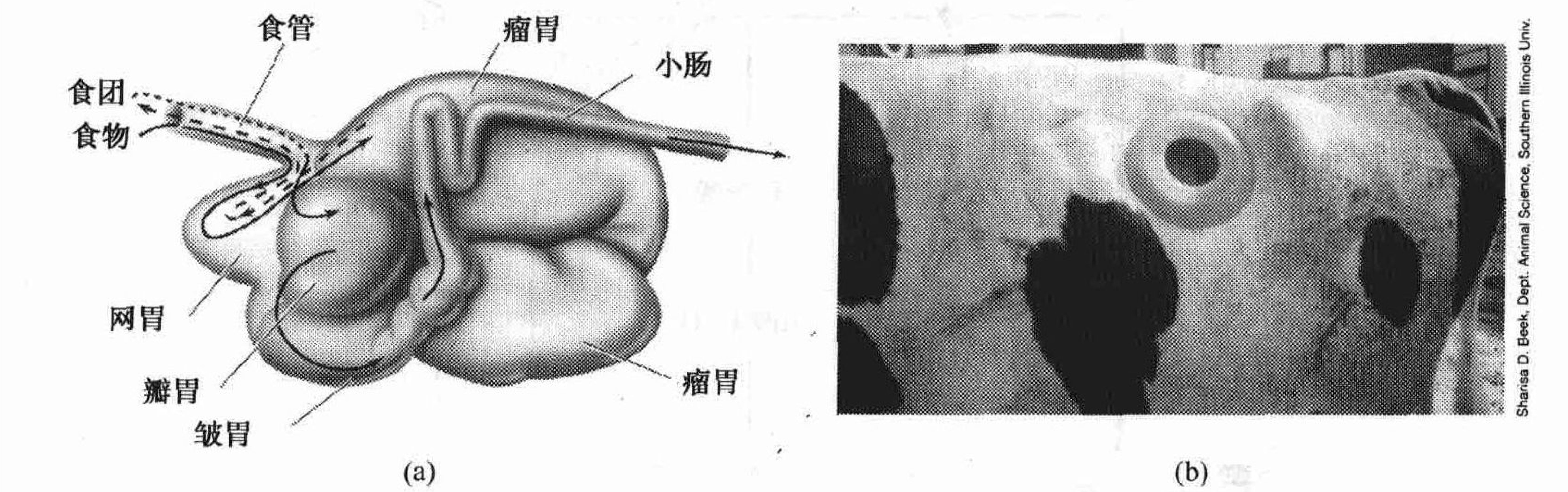


图 19.26　瘤胃。（a）牛的瘤胃和胃肠系统的示意图，食物通过食管进入瘤胃然后回吐，再按顺序进入网胃，瓣胃，皱胃和肠。皱胃是一个酸性器官，类似于单胃动物如猪和人类的胃。（b）已造瘘的 Holstein 牛照片。显示的没有塞子的瘘是一个取样口，能到达瘤胃。造瘘的牛和羊对于研究瘤胃微生物学和反刍动物营养是非常有用的。

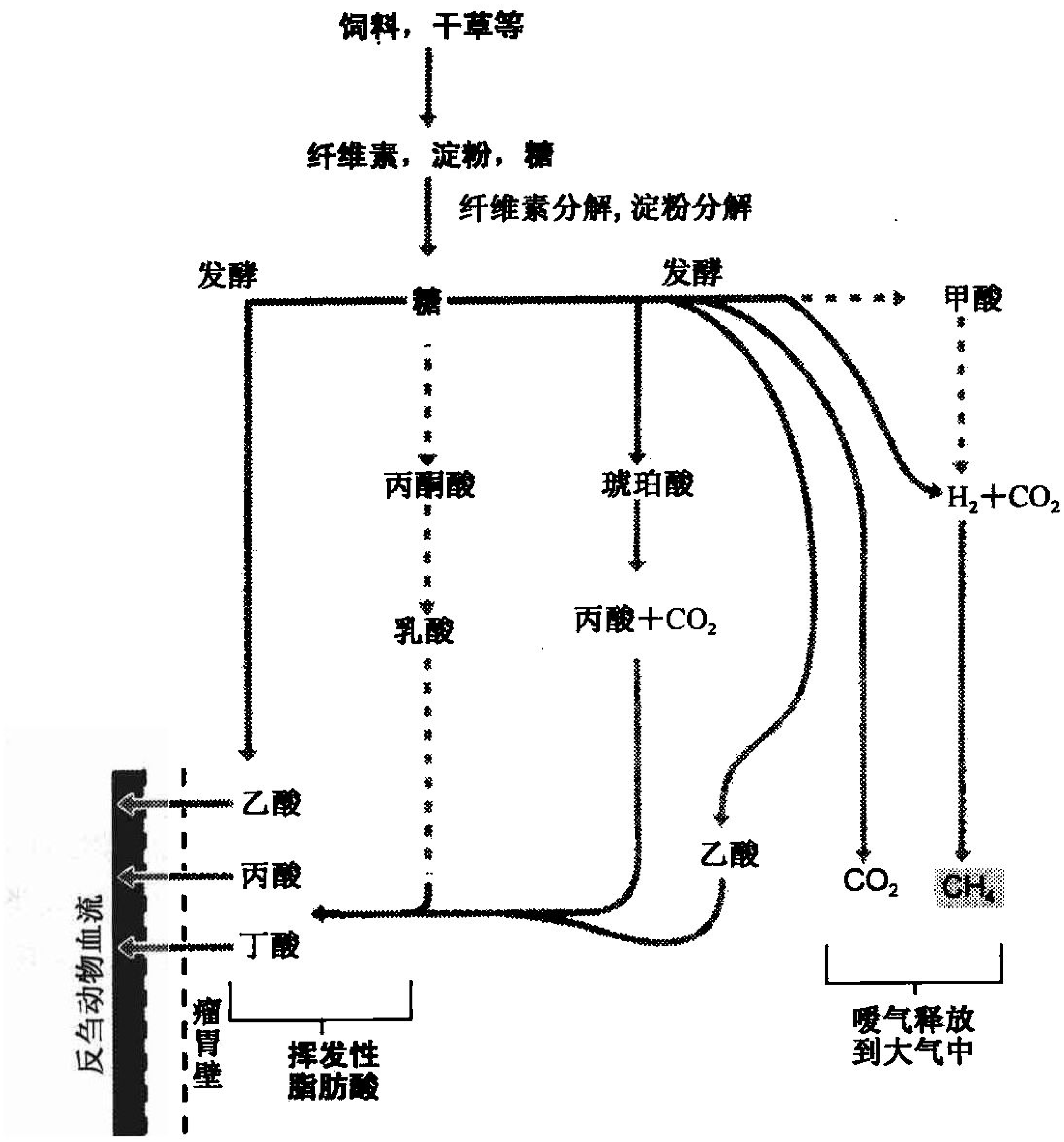
瘤胃中的微生物发酵

食物大约在瘤胃中停留 9～12h，在这个时期分解纤维素的微生物将纤维素水解为纤维二糖和葡萄糖。然后这些释放的葡萄糖经过微生物发酵产生挥发性脂肪酸（volatile fatty acid，VFA），主要是乙酸、丙酸和丁酸及二氧化碳和甲烷气体（图 19.27）。脂肪酸通过瘤胃壁进入血液，被动物氧化作为其主要能量来源。

瘤胃含有大量的原核生物（10^{10}～10^{11}个细菌/g 瘤胃内含物）。瘤胃微生物除了它们的消化作用外，还可以合成氨基酸及维生素，这些是动物必需营养的主要来源。大多数细菌被紧紧地黏附在植物上并给动物喂养这些颗粒，这些物质进入动物的胃肠道，在此进一步经过类似于非反刍动物的消化过程。瘤胃中形成的许多微生物在皱胃中被消化，它们是动物蛋白质和维生素的一个主要来源。因为这种微生物蛋白质可以被动物恢复和利用，因此，当以缺乏蛋白质食物（如草料）为生存物质时，反刍动物在营养上要优于非反刍动物。

瘤胃细菌

瘤胃中的生物化学反应是复杂的，包括各种微生物的联合作用。因为瘤胃是无氧的，所以厌氧细菌自然占优势，而且，因为纤维素转化为 CO_2 和 CH_4 涉及多种微生物食物链，因此存在多种厌氧菌（表 19.6）。



瘤胃发酵的化学计算：

$$57.5\text{葡萄糖} \longrightarrow 65\text{乙酸盐}+20\text{丙酸盐}+15\text{丁酸盐}+60CO_2+35CH_4+25H_2O$$

图 19.27 瘤胃中的生物化学反应。主要起始底物葡萄糖（来自纤维素）和最终产物被涂黑；波折线为次要途径，瘤胃中挥发性脂肪酸稳定水平为乙酸 60mmol/L；丙酸 20mmol/L；丁酸 10mmol/L。挥发性脂肪酸被反刍动物消耗而转化为动物蛋白质，由于这种原因，在瘤胃微生物生态系统中不需要互养的脂肪酸氧化细菌（见 19.10 节）。

表 19.6 一些瘤胃细菌特征

生物	革兰氏染色	系统域[a]	形态学	运动性	发酵产物	DNA/(mol%GC)
纤维素分解菌						
产琥珀酸丝状杆菌[b] (*Fibrobacter succinogenes*)	阴性	B	杆状	—	琥珀酸、乙酸、甲酸	45～51
溶纤维丁酸弧菌[c] (*Butyrivibrio fibrisolvens*)	阴性	B	弯曲杆状	+	乙酸、甲酸、乳酸、丁酸、H_2、CO_2	41
白色瘤胃球菌[b] (*Ruminococcus albus*)	阳性	B	球形	—	乙酸、甲酸、H_2、CO_2	43～46
Clostridium lochheadii	阳性	B	球形(内生孢子)	+	乙酸、甲酸、丁酸、H_2、CO_2	—

续表

生物	革兰氏染色	系统域[a]	形态学	运动性	发酵产物	DNA/(mol%GC)
淀粉分解菌						
栖瘤胃普雷沃氏菌 (*Prevotella ruminicola*)	阴性	B	杆状	−	甲酸、乙酸、琥珀酸	40～42
嗜淀粉瘤胃杆菌 (*Ruminobacter amylophilus*)	阴性	B	杆状	−	甲酸、乙酸、琥珀酸	49
反刍月形单胞菌 (*Selenomonas ruminantium*)	阴性	B	弯曲杆状	+	乙酸、丙酸、乳酸	49
溶淀粉琥珀酸单胞菌 (*Succinomonas amylolytica*)	阴性	B	卵圆形	+	乙酸、丙酸、琥珀酸	−
牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)	阳性	B	球形	−	乳酸	37～39
乳酸分解菌						
解乳月形单胞菌 (*Selenomonas lactilytica*)	阴性	B	弯曲杆状	+	乙酸、琥珀酸	50
埃氏巨球形菌 (*Megasphaera elsdenii*)	阳性	B	球形	−	乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、H_2、CO_2	54
琥珀酸分解菌						
食琥珀酸施瓦茨氏菌 (*Schwartzia succinovorans*)	阴性	B	杆状	+	丙酸、CO_2	46
果胶分解菌						
多对毛螺菌 (*Lachnospira multiparus*)	阳性	B	弯曲杆状	+	乙酸、甲酸、乳酸、H_2、CO_2	−
产甲烷菌						
瘤胃甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter ruminantium*)	阳性	A	杆状	−	CH_4(从 H_2+CO_2 或甲酸)	31
运动甲烷微菌 (*Methanomicrobium mobile*)	阴性	A	杆状	+	CH_4(从 H_2+CO_2 或甲酸)	49

a. B：细菌；A：古生菌。

b. 这些种也降解木聚糖，该糖是植物细胞壁的一种主要多糖（表 17.25）。

c. 也降解淀粉。

几种不同的瘤胃细菌可分解多聚体，如把纤维素分解为糖，并发酵糖为挥发性脂肪酸。产琥珀酸丝状杆菌（*Fibrobacter succinogenes*）和白色瘤胃球菌（*Ruminococcus albus*）是两种最多的分解纤维素的瘤胃厌氧细菌，尽管这两种生物产生纤维素酶，但丝状杆菌属（*Fibrobacter*）是一种革兰氏阴性菌，含有周质纤维素酶（见 4.9 节）降解纤维素，因为这样，当丝状杆菌属细胞消化纤维素时，必须附着在纤维素纤丝上；另一方面瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）产生纤维素酶，该酶分泌到瘤胃内容物中（它是一种胞外酶），在细菌细胞外分解纤维素，这两种情况的最终结果是一样的，即游离的葡萄糖可被发酵厌氧细菌利用。

如果一种反刍动物逐渐地从喂纤维素饲料转向高淀粉的饲料（如谷物），那么瘤胃

中消化淀粉的细菌［如嗜淀粉瘤胃杆菌（*Ruminobacter amylophilus*）和溶淀粉琥珀酸单胞菌（*Succinomonas amylolytica*）］就会增殖到很高数量，但在喂低含量淀粉饲料中，这些微生物是次要组分。如果用含有高浓度多糖果胶的豆科牧草喂动物，那么分解果胶的细菌多对毛螺菌（*Lachnospira multiparus*）（表 19.6）就成了瘤胃菌群中的主要成员。

有时，瘤胃中微生物组成的改变可引起动物生病甚至死亡。例如，如果一头牛的饮食突然从草料完全改为谷物类食物，在其瘤胃中会发现牛链球菌（*Streptococcus bovis*）大量生长；从正常水平的 10^7 个细胞/g（对于瘤胃总的细菌数是不重要的），快速增加到 10^{10} 个细胞/g 以上，这是因为草料主要含有纤维素，而谷物含有高含量的淀粉，牛链球菌可在淀粉上快速生长。作为乳酸细菌（见 12.19 节），牛链球菌进行淀粉发酵产生大量乳酸，这会酸化瘤胃（称为酸中毒），杀死正常的瘤胃菌群。严重的酸中毒可以引起动物死亡。为了避免酸中毒，动物需用一段时间逐渐地从饲料转变成谷物，在饮食中缓慢地添加淀粉，选择产生挥发性脂肪酸的淀粉降解者来替代牛链球菌，这样正常的瘤胃生化过程不会被破坏。

一些分解糖的瘤胃微生物的发酵产物被瘤胃中次级发酵菌作为能量来源，因此，琥珀酸被施瓦茨氏菌属（*Schwartzia*）发酵为丙酸和 CO_2（图 19.27），乳酸被月形单胞菌属（*Selenomonas*）和巨球形菌属（*Megasphaera*）发酵为乙酸和其他酸类（表 19.6）。发酵生成的氢从不在瘤胃中积累，因为它可以被产甲烷菌很快消耗。尽管瘤胃中具有高浓度的挥发性脂肪酸，但互养菌（见 19.10 节）并不起主要作用，因为动物本身是一个主要的脂肪酸库（图 19.27）。也就是说，由于丙酸和丁酸被动物消耗（图 19.27），瘤胃中互养转化（表 19.4 和图 19.23）过程是不需要的。

瘤胃原生动物和真菌

除原核生物外，瘤胃中还有特有的原生动物群落（约 10^6 个/ml），几乎全是由纤毛虫组成的（见 14.10 节）。这些原生动物多数是专性厌氧生物，这个特性在真核生物中是很少见的，尽管原生动物不是瘤胃发酵所需的，但它们有助于这一过程。实际上，一些原生动物能够水解纤维素和淀粉，发酵葡萄糖，产生同细菌发酵一样的有机酸（表 19.6）。瘤胃原生动物也吞食瘤胃细菌作为食物来源，这在控制瘤胃细菌密度上起重要作用。

厌氧真菌也存在于瘤胃中，并在瘤胃消化过程中起着重要作用。瘤胃真菌是那些能在鞭毛式和菌体式之间变化的种，通过纯培养研究显示它们可以发酵纤维素产生挥发性脂肪酸。例如，*Neocalimastix* 是一种专性厌氧真菌，发酵葡萄糖为甲酸、乙酸、乳酸、乙醇、CO_2 和 H_2。尽管是真核生物，但这种真菌缺少线粒体和细胞色素，因此以专性发酵方式存在，但 *Neocalimastix* 细胞含有一种氧化还原器官，称为氢化酶体(hydrogenosome)，其功能是释放 H_2，因此，只是在某些系统发育上的"早期分支"的真核生物中发现（见 14.2 节，14.4 节和 14.9 节）。瘤胃真菌在降解植物多糖中具有重要的作用，不仅是纤维素，还包括对木质素（木本植物细胞壁的主要成分）、半纤维素和果胶的部分降解。

反刍动物饲养过程和食物传染疾病

最近几年，对安全性的考虑已经出现在反刍动物饲养过程中及对动物微生物区系尤其是牛的影响。人类严重地改变了家养反刍动物的饮食，从一种饮食饲料变成更多淀粉的谷物饮食。谷物可以快速提高动物的体重，并且使动物的肉质更加鲜嫩，因此，喂养谷物的动物可以快速上市出售，它们的肉具有更大的价值。可是，正如我们所看到的，高淀粉饮食不仅影响瘤胃微生物区系，而且还影响瘤胃肠道下游的微生物组成（图 19.26a），特别是使喂养谷物动物的肠道 pH 更为酸性，这种条件使耐酸的肠致病性大肠杆菌（*Escherichia coli*）[如大肠杆菌 O157：H7（见 29.8 节）] 比不太耐酸的非致病性菌株占优势。当喂养谷物动物被宰杀时，大肠杆菌细胞可以黏附在尸体上，由此带入到肉产品中，特别是牛肉馅和牛肉香肠等肉馅产品，因此，增加了食物传染疾病的危险性（见 29.8 节）。

其他草食动物：盲肠动物

我们所熟悉的反刍动物是牛和绵羊，山羊、骆驼、水牛、鹿、驯鹿、麋也都是反刍动物，然而，尽管马和兔子也是草食动物，但它们不是反刍动物，这些动物只有一个胃，并且用称为盲肠（cecum）的器官作为纤维素分解发酵的场所，盲肠是位于小肠后面、大肠前面的一个消化器官，盲肠含有分解纤维素的微生物，在此消化纤维素。在营养上，反刍动物比盲肠动物有优势，因为反刍动物中分解纤维素的菌群最终要经过一个真正的（酸性）胃，并被杀死，这些可作为动物一种蛋白质来源，与此相比，在马和兔子中，分解纤维素菌群从动物的粪便中排出。

概念检查

反刍动物是指具有特殊消化器官——瘤胃的动物，瘤胃是一个独特的生态系统，其中有厌氧微生物可消化饲料中不可溶的饲料成分（如纤维素和淀粉）。瘤胃中的细菌、原生动物和真菌产生挥发性脂肪酸，可被反刍动物利用，瘤胃微生物除了在消化过程中的作用外，它们还合成反刍动物可利用的维生素和氨基酸，同时也是反刍动物蛋白质的主要来源。

◆ 瘤胃中物理的和化学的优势条件是什么？

◆ 什么是挥发性脂肪酸，它在反刍动物中的价值是什么？

◆ 为什么牛链球菌的代谢对反刍动物的营养有特殊的关系？食物传染疾病是如何由反刍动物饲养过程引起的？

◆ 盲肠动物与反刍动物在它们的消化道解剖学上有何不同？

V 其他主要的营养循环

尽管大量的碳是自然界主要的循环元素，但动植物代谢中的许多其他重要元素是由微生物进行循环的，包括氮、硫和铁，这里我们讨论这些主要营养物质的循环。

19.12 氮循环

元素氮是原生质的一个主要成分，存在于许多氧化作用中（表 17.2)。我们已讨论了 3 种主要的微生物氮转化过程：硝化作用（见 17.12 节）、反硝化作用（见 17.14 节）和固氮作用（见 17.28 节），图 19.28 概括了这 3 种和几种其他形式氮转化的氧化还原循环。

氮循环中的主要过程和原核生物

过程	微生物类别
硝化作用 ($NH_4^+ \rightarrow NO_3^-$)	
$NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$	亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)
$NO_2^- \rightarrow NO_3^-$	硝化杆菌属(*Nitrobacter*)
反硝作用 ($NO_3^- \rightarrow N_2$)	芽孢杆菌属(*Bacillus*)、副球菌属(*Paracoccus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)
固氮作用 ($N_2 + 8H \rightarrow NH_3 + H_2$)	
自由生活	
需氧的	固氮菌属(*Azotobacter*) 蓝细菌属(*Cyanobacteria*)
厌氧的	梭菌属(*Clostridium*)，紫色和绿色细菌
共生的	根瘤菌属(*Rhizobium*) 慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*) 弗兰克氏菌属(*Frankia*)
氨化作用(有机氮 $\rightarrow NH_4^+$)	许多生物可以进行该反应
厌氧氨氧化($NO_2^- + NH_3 \rightarrow 2N_2$)	布罗卡德氏菌属(*Brocadia*)

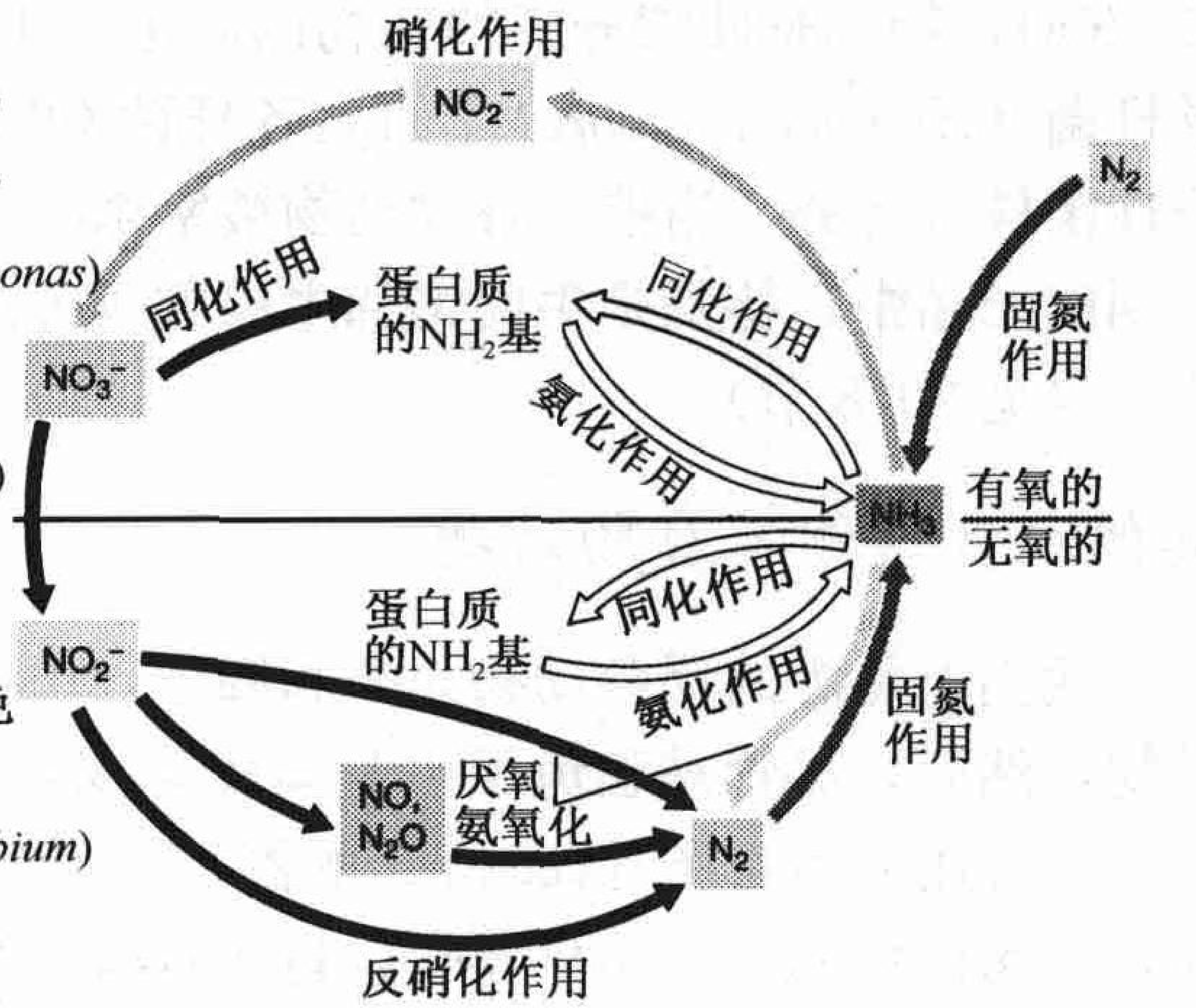


图 19.28　氮的氧化还原循环。氧化反应用黄色箭头表示，还原反应用红色箭头表示，反应中没有氧化还原电势发生的用白色箭头表示。对于更为完整的固氮原核生物见表 17.10。

固氮作用

自然界中几个主要的氮氧化还原反应几乎全是由微生物完成的（图 19.28），氮气（nitrogen，N_2）是氮最稳定的形式，是地球上氮主要的储存库，但是，只有相对少数几类生物可以利用 N_2，作为固氮作用（nitrogen fixation）的氮源（$N_2+8H \rightarrow 2NH_3+H_2$）（见 17.28 节）。地球上氮的再循环更大程度涉及容易利用的氮形式，如氨基酸和硝酸盐，但是在许多环境中，这类氮化合物供给不足，由此生物固氮作用具有重要意义。当我们在本章后面讲述豆科植物共生固氮时（见 19.22 节），将再次讨论这个重要过程。

反硝化作用

在 17.14 节我们讨论了无氧呼吸中硝酸盐（nitrate）作为一个可变的电子受体的作用。在多数条件下，硝酸盐还原作用的最终产物是 N_2 或 N_2O，将硝酸盐转化为气态氮化合物称为反硝化作用（denitrification）（图 19.28），这个过程是生物形成气态 N_2 的主要方式。另一方面，反硝化作用是一个有害的过程。例如，当几场非常大的春雨过后，富含硝酸盐的田地就会变成典型的渍水土壤，然后无氧条件很快形成，反硝化作用扩大，它可以除去土壤中已固定的氮。另外，反硝化作用还有助于废水处理（见 28.2

节)，当排到湖泊和小溪中的水通过反硝化作用去除硝酸盐后，可减少藻类生长。

氨流动、硝化作用和厌氧氨氧化

氨是在分解有机氮化合物（如氨基酸和核苷酸）过程中产生的［氨化作用（ammonification)，图 19.28］，在中性 pH 时，氨以铵离子（NH_4^+）形式存在。在无氧条件下，氨相当稳定（见 17.12 节），在多数无氧沉积物中，这种形式的氮占主要地位。土壤中，由需氧分解作用释放的大部分氨很快被再循环，转化成植物和微生物中的氨基酸。氨具挥发性，由于蒸发作用土壤中损失了一部分氨（特别是高碱性土壤），氨的主要损失是挥发到大气中，这种情况一般发生在动物群居密度较高的地方（如牛棚）。但从全球来看，氨只占释放到大气中的氮的约 15%，其他的氮主要以 N_2 或 N_2O 的形式存在（从反硝作用中释放）。

硝化作用（nitrification）易发生在排水通畅的中性 pH 土壤中，由硝化细菌的活动将 NH_3 氧化成 NO_3^-（见 12.3 节和 17.12 节，图 19.28）。反硝化作用消耗硝酸盐，而硝化作用产生硝酸盐。如果把富含蛋白质的物质（如肥料或污水）添加到土壤中，就会提高硝化作用的速率，尽管硝酸盐很容易被植物同化，但在得到雨量大的土壤中，它易溶于水并迅速地滤出。因此，硝化作用不利于植物农业。另一方面，氨带有正电荷，因此，会牢固的吸附到带负电荷的富含黏土的土壤上。

无水氨被广泛用作氮肥，同时化学物质添加到肥料中，将抑制硝化作用，最普遍的硝化作用抑制剂之一就是一个替代吡啶化合物的物质，称为 nitrapyrin（2-氯-6-三氯甲基吡啶，也称为 N-SERVE)。nitrapyrin 特异地抑制第一步硝化作用，即 NH_3 氧化成 NO_2^-（见 17.12 节），这就有效地抑制硝化作用过程中的步骤，即第二步，$NO_2^- \rightarrow NO_3^-$。因为该过程依赖第一步，所以添加硝化作用的抑制剂可以大大地增加施肥的效率，有助于防止从肥沃土壤中渗漏出硝酸盐而污染水道。

氨在无氧条件下，由布罗卡德氏菌属（*Brocadia*）及相关生物催化的过程称为厌氧氨氧化（anammox)。在这个反应中，亚硝酸盐（NO_2^-）作为电子受体使氨被氧化，形成最终产物 N_2（图 19.28)。已在 17.12 节讨论了厌氧氨氧化的微生物学和生物化学。

概念检查

地球上氮的主要形式是氮气（N_2)，它作为固氮细菌的唯一氮源，通过固氮作用或有机氮化合物氨化作用产生的氨可以被同化进入有机物中，也可被硝化细菌氧化成硝酸盐。由于反硝化作用使得硝酸盐又转化为 N_2，从而造成生物圈中的氮损失。

- 什么叫固氮作用？为什么说它是重要的？
- 什么过程导致 $NO_3^- \rightarrow N_2$？
- 化合物 nitrapyrin 对农业和环境的好处是怎样的？
- 硝化作用与反硝化作用有何不同？硝化作用与厌氧氨氧化有何不同？

19.13 硫循环

硫的转化要比氮复杂得多，因为硫有不同的氧化状态（图 19.29；表 17.3），另外，与氮不同，某些硫可以通过化学以及生物方式进行转化。分别在 17.15 节和 17.10 节中讲述了硫酸盐还原过程和化能无机营养硫氧化过程。图 19.29 显示了硫的氧化还原循环和硫转化中所涉及的微生物。尽管硫可能有多种氧化价态，但自然界中只有 3 种是有重要意义的：－2（巯基 R-SH 和硫化物 HS^-），0（元素硫，S^0）和＋6（硫酸盐，SO_4^{2-}）。尽管生物圈中海洋是硫（如硫酸盐）最重要的储存库，但地球上大量的硫在沉积物和岩石中是以硫酸盐矿（主要是石膏，$CaSO_4$）和硫化物矿（主要是黄铁矿，FeS_2）形式存在的。

硫循环中的主要过程和原核生物

过程	微生物
硫化物/硫氧化作用（$H_2S \rightarrow S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$）	
需氧的	硫化能无机营养菌[硫杆菌属(*Thiobacillus*)、贝日阿托氏菌属(*Beggiatoa*)和许多其他属]
厌氧的	紫色和绿色光合细菌，某些化能无机营养菌
硫酸盐还原作用（厌氧的）（$SO_4^{2-} \rightarrow H_2S$）	
	脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)，脱硫菌属(*Desulfobacter*)
硫还原作用（厌氧的）（$S^0 \rightarrow H_2S$）	
	脱硫单胞菌属(*Desulfuromonas*)，许多超嗜热古生菌
硫歧化作用（$S_2O_3^{2-} \rightarrow H_2S + SO_4^{2-}$）	
	脱硫弧菌属和其他属
有机硫化合物氧化作用或还原作用（$CH_3SH \rightarrow CO_2 + H_2S$）（DMSO → DMS）	
	许多生物可以进行该反应
脱硫作用（无机S → H_2S）	
	许多生物可以进行该反应

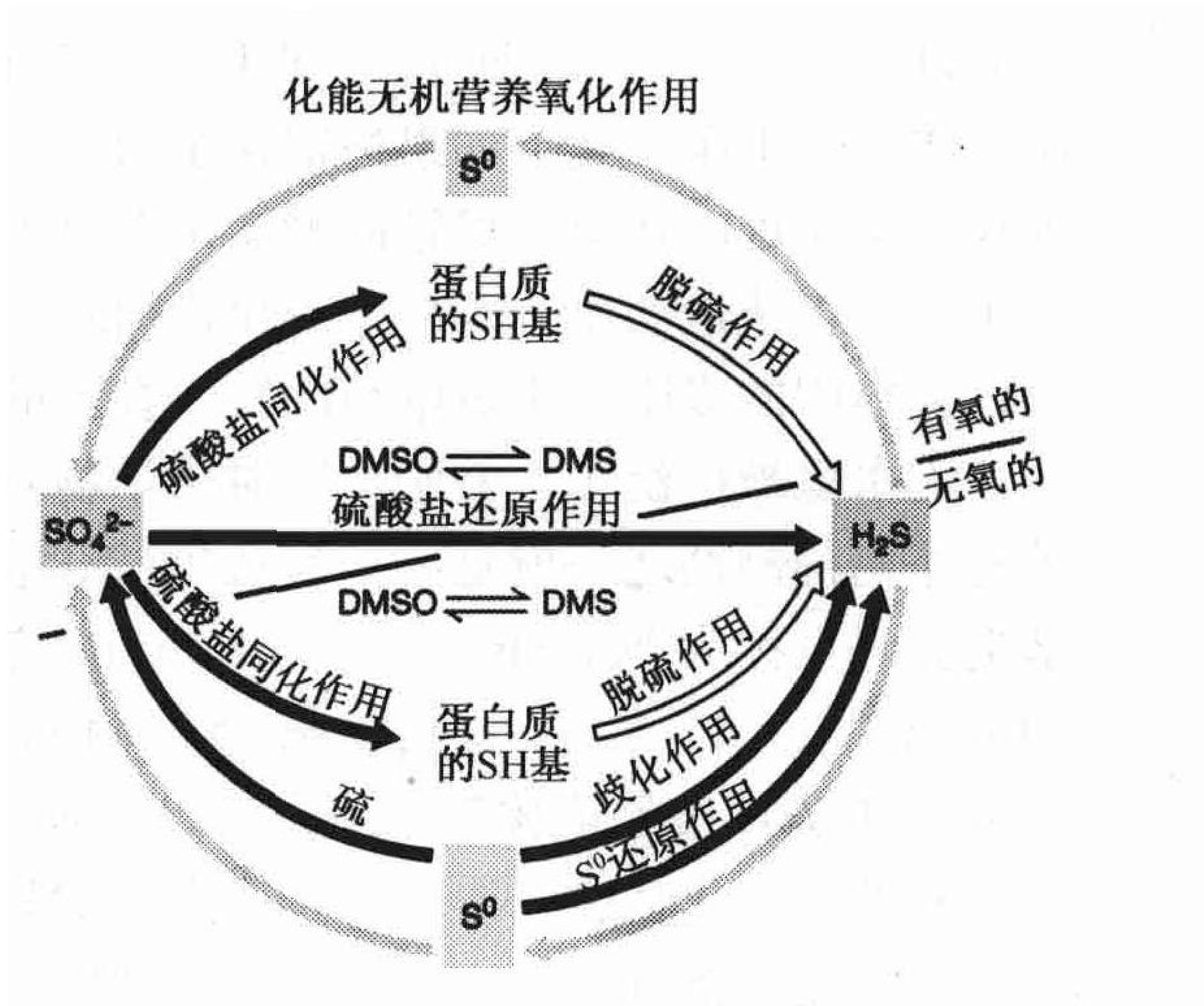


图 19.29　硫的氧化还原循环。氧化反应用黄色箭头表示，还原反应用红色箭头表示，反应中没有氧化还原电势发生的用白色箭头表示。DMSO（dimethylsulfoxide）：二甲基亚砜；DMS（dimethylsulfide）：二甲基硫化物。

硫化氢和硫酸盐还原作用

一种主要的挥发性硫气体是硫化氢（H_2S）。硫化物是由细菌的硫酸盐还原作用产生（$SO_4^{2-}+8H^+ \rightarrow H_2S+2H_2O+2OH^-$）（图 19.29）或地球化学物质硫化泉和火山喷发形成的。尽管 H_2S 是挥发性的，但环境中存在的硫化氢形式是 pH 依赖的：低于 pH 7 时，H_2S 占主要的；而高于 pH 7 时，HS^- 和 S^{2-} 是主要形式。

硫酸盐还原细菌是一类高度多样的类群（见 12.18 节），在自然界广泛分布。尽管在许多无氧生境（如淡水和多数土壤）中，由于存在的硫酸盐水平低，它们的活动受到限制。另外，因为需要有机的电子供体（或分子氢，它是由有机化合物发酵形成的）驱使硫酸盐进行还原作用，后者只发生在有大量有机物存在的地方。在大多数的海洋沉积物中，硫酸盐还原作用的速率受到碳的限制，当添加有机物质后，其还原速率大大提高。这是很重要的，因为排放到海洋中的污水、淤泥和垃圾可以导致沉积物中有机物的

明显增加，从而触发海洋硫化物污染。

因为对于许多生物来说，硫化物（HS^-）是一种有害物质，所以硫酸盐还原作用形成的HS^-存在着潜在的危害，因为它可以结合细胞中细胞色素的铁和其他含铁的必需化合物。环境中一种普遍的硫化氢解毒机制是与铁结合，形成了不溶性的 FeS 和 FeS_2（黄铁矿），这就是许多沉积物呈黑色的原因。

硫化物和元素硫的氧化作用/还原作用

在有氧条件下，硫化物（HS^-）在中性 pH 下很快自发氧化（见 17.10 节），氧化硫细菌，大多数是需氧菌，能够催化硫化物的氧化作用，但由于这是快速自发的反应，所以典型的细菌硫化物氧化反应只发生从无氧区产生的 H_2S 和有氧区 O_2 相遇的地方。另外，如果有光照的话，由光养硫细菌催化，也可以发生 HS^- 无氧氧化反应（见 12.2 节、12.32 节和 17.4 节）。

元素硫 S^0 在化学上是比较稳定的，但易被氧化硫细菌，如硫杆菌属（*Thiobacillus*）和嗜酸硫杆菌属（*Acidithiobacillus*）氧化（见 12.4 节和 17.10 节）。元素硫是不溶性的，氧化它的细菌牢固地附着在硫晶体上（图 17.26b），元素硫的氧化作用形成硫酸盐（SO_4^{2-}）和质子，因此，硫氧化作用的特点是导致 pH 降低。有时把元素硫加到碱性土壤中可降低土壤 pH，因此可依赖普遍存在的硫杆菌来完成酸化过程。

S^0 除了氧化作用外，也可以被还原。硫还原为硫化物（厌氧呼吸的一种形式，见 17.15 节）是一个主要的生态学过程，特别是在超嗜热古生菌中（第 13 章）。尽管硫酸盐还原菌也可以完成这个反应，但自然界中大量的 S^0 还原反应可能出现的是不同的 S^0 还原者不能还原 SO_4^{2-} 为 H_2S。而且，S^0 还原者的生境一般是硫酸盐还原者的生境，因此，从生态学观点看，这两种类群形成了一个共位群（见 19.1 节），并且共同存在。

有机硫化合物

除了我们所讨论的生物地球化学无机硫的形式外，还有一大部分是由生物体合成的有机硫化合物，它们也进入生物地球化学的硫循环，这些腐臭化合物多数是高度挥发性的，因此，可以进入大气中。自然界中数量最多的有机硫化合物是二甲基硫化物（$H_3C—S—CH_3$），主要在海洋环境中产生，它是二甲基砜丙酸盐（dimethylsulfoniopropionate）的降解产物，二甲基硫化物是海洋藻类的一种主要渗透调节剂（见 6.14 节）。二甲基砜丙酸盐可以作为微生物的碳源和能源，它被催化为二甲基硫化物和丙烯酸盐，后者是脂肪酸丙酸的衍生物，可以支持微生物的生长。

释放到大气中的二甲基硫化物经过光化学氧化作用形成甲烷磺酸（$CH_3SO_3^-$）、SO_2 和 SO_4^{2-}；相反，在无氧生境中产生的二甲基硫化物可以至少以 3 种途径被微生物转化：①在产甲烷作用中（产生 CH_4 和 H_2S）；②作为光养紫色细菌光合作用固定 CO_2 的电子供体[产生二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）]；③作为某些化能有机营养菌和化能无机营养菌能量代谢的电子供体（也产生 DMSO）。产生的 DMSO 可作为厌氧呼吸的电子受体（见 17.18 节），再一次产生二甲基硫化物。许多其他有机硫化合物也影响全球的硫循环，包括巯基甲烷（CH_3SH），二甲基二硫化物（$H_3C—S—S—CH_3$）和二硫化碳（CS_2），但从全球来讲，二甲基硫化物（dimethyl sulfide）是最重要的。

概念检查

细菌在硫循环的氧化和还原方面起着重要作用。硫和硫酸盐氧化细菌产生硫酸盐，而硫酸盐还原细菌在厌氧呼吸中利用硫酸盐作为电子受体，产生硫化氢。因为硫化物有害，可以与各种金属发生反应，所以硫酸盐还原作用在生物地球化学过程中很重要。二甲基硫化物是自然界中具有生态意义的重要有机硫化合物。

◆ H_2S 是硫酸盐还原细菌的底物还是产物？是化能无机营养菌的底物还是产物？

◆ 为什么细菌硫氧化作用导致 pH 下降？

◆ 为什么有机硫化合物是自然界中最多的？

19.14 铁循环

铁是地壳中数量最多的元素之一，在地球表面，铁存在两种天然的氧化状态，亚铁（Fe^{2+}）和高铁（Fe^{3+}），Fe^0 只是人类在铁矿熔化形成铸铁活动中的主要产物。自然界中，元素铁主要在亚铁和高铁形式之间循环。Fe^{3+} 的还原作用发生在化学上和作为厌氧呼吸的形式，Fe^{2+} 的氧化作用发生在化学上和作为化能无机营养代谢的形式（图 19.30）。

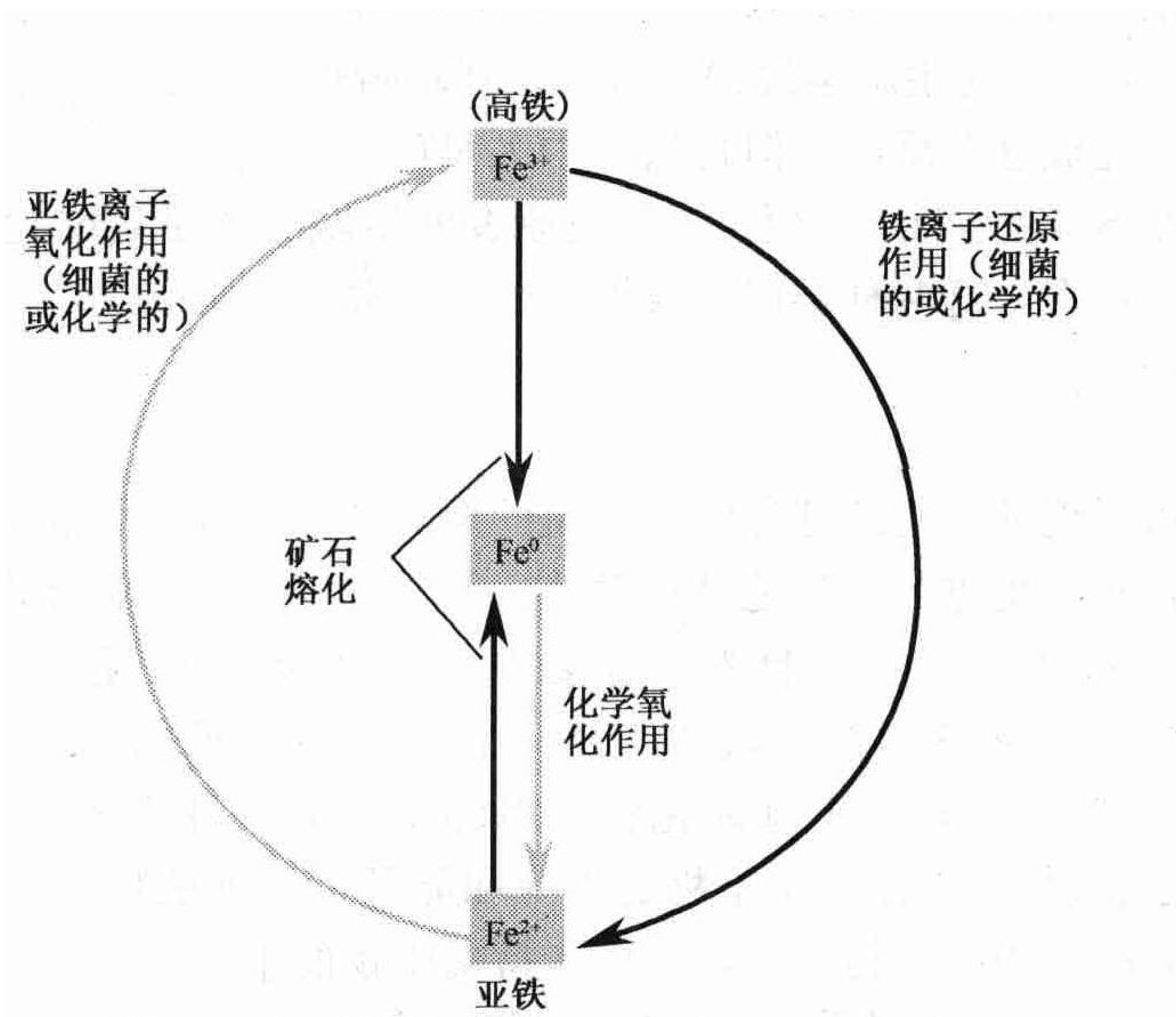


图 19.30 铁的氧化还原循环。自然界中铁的主要形式是 Fe^{2+} 和 Fe^{3+}；Fe^0 是人类熔化铁矿活动中的主要产物。亚铁氧化作用在有氧时由铁化能无机营养菌完成（或在中性 pH 下通过化学反应完成），在无氧时由某些不产氧光合营养细菌和反硝化细菌完成。氧化作用用黄色箭头表示，还原作用用红色箭头表示。

细菌的铁还原作用

许多生物可以把高铁作为电子受体（图17.18)。在渍水土壤、酸沼（bog）和无氧的湖泊沉积物中，高铁还原作用是普遍发生的。富铁的地下水从酸沼或渍水土壤中消失可导致大量亚铁的转移，当这些含铁的水到达有氧地域，亚铁被化学的或通过铁细菌被氧化（图17.11)，然后高铁化合物沉淀，导致形成褐色的沉积物（图17.28c)：

$$Fe^{2+}+\frac{1}{4}O_2+2\frac{1}{2}H_2O \rightarrow Fe(OH)_3+2H^+$$

氢氧化铁沉淀可以与其他非生物物质［如腐殖质（见19.9节)］作用，将Fe^{3+}还原成Fe^{2+}（图19.30)，高铁也可与各种有机物质形成复合物，这样，它就变成可溶性的，再一次成为高铁还原细菌的电子受体。

酸性pH下亚铁和黄铁矿氧化作用

能够自发氧化Fe^{2+}的电子受体只有O_2。在中性生境中，Fe^{2+}可以被铁细菌［如嘉利翁氏菌属（*Gallionella*）和纤发菌属（*Leptothrix*)］氧化（见12.15节和12.16节)，这主要发生在富含亚铁无氧的地下水和空气的界面。但是，多数细菌的铁氧化作用发生在Fe^{2+}不易发生自发氧化作用的酸性pH条件下。在极端酸性的生境中，嗜酸化能无机营养菌氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）及其相关的铁氧化嗜酸菌氧化Fe^{2+}为Fe^{3+}（图19.31)。亚铁氧化为高铁时产生很少的能量（见17.11节)，所以这些细菌为了生长必须氧化大量的铁，结果少量的细胞就可以使大量的铁形成沉淀，氧化亚铁嗜酸硫杆菌是严格的嗜酸菌，在酸性矿排出水和酸性泉水中较为常见，它在中等酸性（pH 2～4）条件下可能会使大多数高铁发生沉淀。

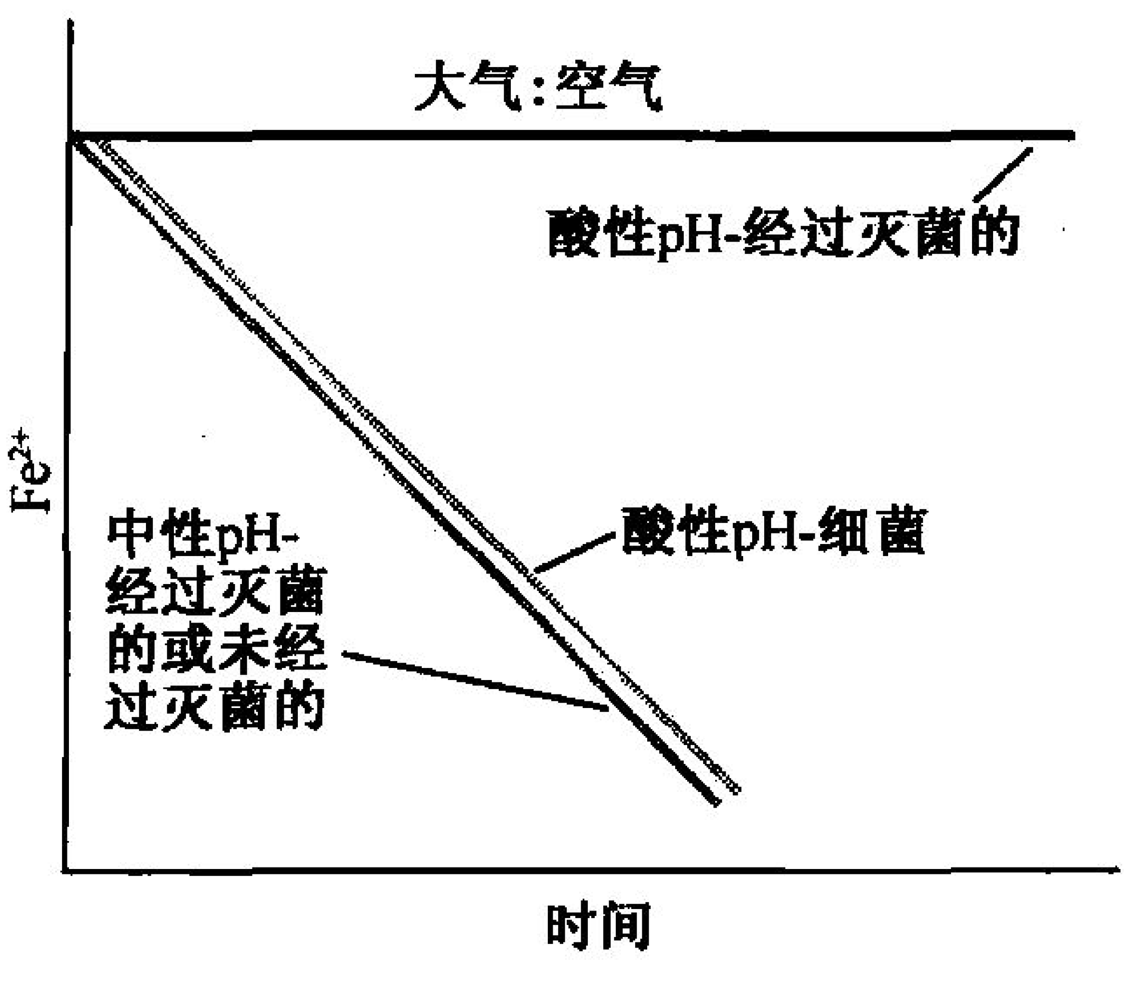


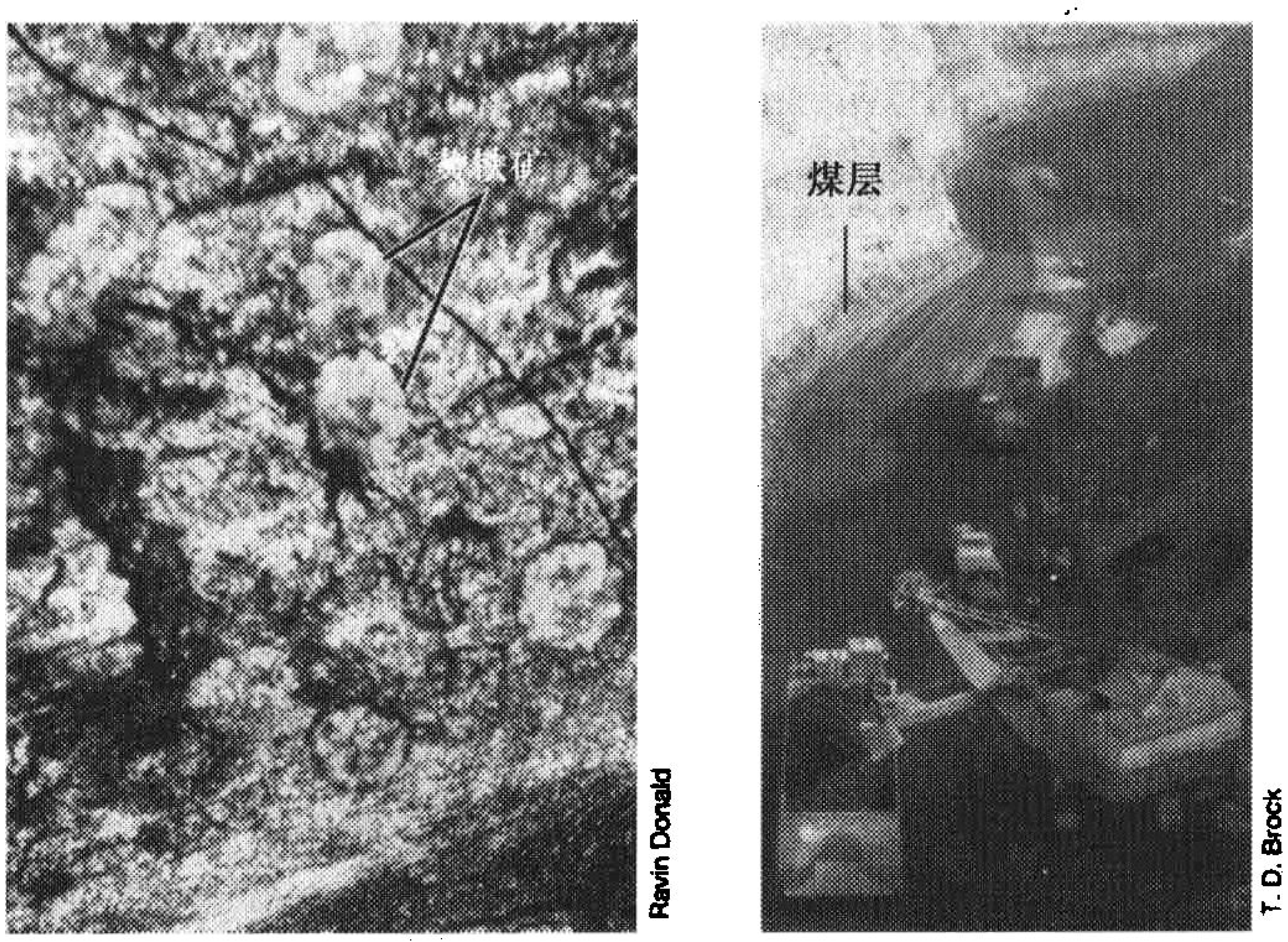


图19.31 Fe^{2+}氧化作用。（a）氧化亚铁嗜酸硫杆菌存在的亚铁氧化作用导致pH的变化。注意在缺乏细菌细胞的酸性条件下，Fe^{2+}是稳定的。（b）西班牙Rio Tinto地区含有嗜酸绿藻和各种铁氧化原核生物的微生物垫。河流是高度酸性的，并含有高浓度的不溶金属，特别是Fe^{2+}，红棕色沉淀物含有Fe^{3+}。

硫酸和大量的硫酸盐存在的地方是氧化亚铁嗜酸硫杆菌和铁氧化钩端螺菌（*Lepto-*

spirillum ferrooxidans）所生存的环境，在 20～30℃、中等酸度 pH 时，氧化亚铁嗜酸硫杆菌占主要地位；而在 30～50℃、更酸 pH（1～2）时，铁氧化钩端螺菌是主要生物。在这些条件下，高铁不能作为氢氧化物而沉淀，而是以一种复杂的硫酸盐矿的形式存在，称为黄钾铁矾［jarosite，$HFe_3(SO_4)_2(OH)_6$］。黄钾铁矾是一种黄色或褐色沉淀，是酸性矿排出的水的一种主要污染物，美国矿工把这种不好看的黄色斑点称为“黄孩子”（图 17.28a 和图 19.34）。氧化亚铁嗜酸硫杆菌和铁氧化钩端螺菌在系统进化和形态上完全不同，而且它们的代谢也不一样，铁氧化钩端螺菌只在 Fe^{2+} 中生长，而氧化亚铁嗜酸硫杆菌在 Fe^{2+} 或 S^0 中以化能无机营养型生长。

自然界中铁最普遍的形式之一是黄铁矿（pyrite，FeS_2）。黄铁矿是由硫与硫化亚铁（FeS）反应形成的不溶性的结晶结构，并普遍存在于烟煤和许多矿体中（图 19.32a）。在酸性条件的煤矿开采中（图 19.32b），细菌对黄铁矿的氧化作用非常重要，另外，细菌对黄铁矿的氧化作用在微生物浸矿（microbial leaching of ores）（见 19.15 节）中非常重要，黄铁矿的氧化是化学和生物相结合的催化反应，2 个电子受体参与这个过程：分子氧（O_2）和高铁（Fe^{3+}）。



(a) (b)

图 19.32 黄铁矿和煤矿。煤矿中的黄铁矿可以被硫和铁氧化细菌所氧化。美国亚利桑那州（Arizona）北部 Black Mesa 形成的一块煤的切片。切片中金色圆形盘（直径约 1mm）是黄铁矿 FeS_2 颗粒。(b) 表面煤矿开采的煤层。煤暴露在有氧潮湿的环境中，刺激铁氧化细菌在煤的黄铁矿中生长。

在采矿开始时（图 19.32b），黄铁矿首次被暴露，一个与分子氧缓慢的化学反应按图 19.33 的方式进行，这个反应称为起始反应，导致硫化物氧化成硫酸盐，并且形成酸性条件。在这个条件下，当释放的亚铁在氧存在时，相对稳定。然后氧化亚铁嗜酸硫杆菌和铁氧化钩端螺菌催化亚铁氧化成为高铁，在酸性条件下形成的可溶性高铁可自发地与黄铁矿反应，氧化黄铁矿为亚铁离子和硫酸盐离子：$FeS_2 + 14Fe^{3+} + 8H_2O \rightarrow 15Fe^{2+} + 2SO_4^{2-} + 16H^+$。

形成的亚铁离子又被细菌氧化为高铁离子，然后这些高铁离子又与黄铁矿反应，因

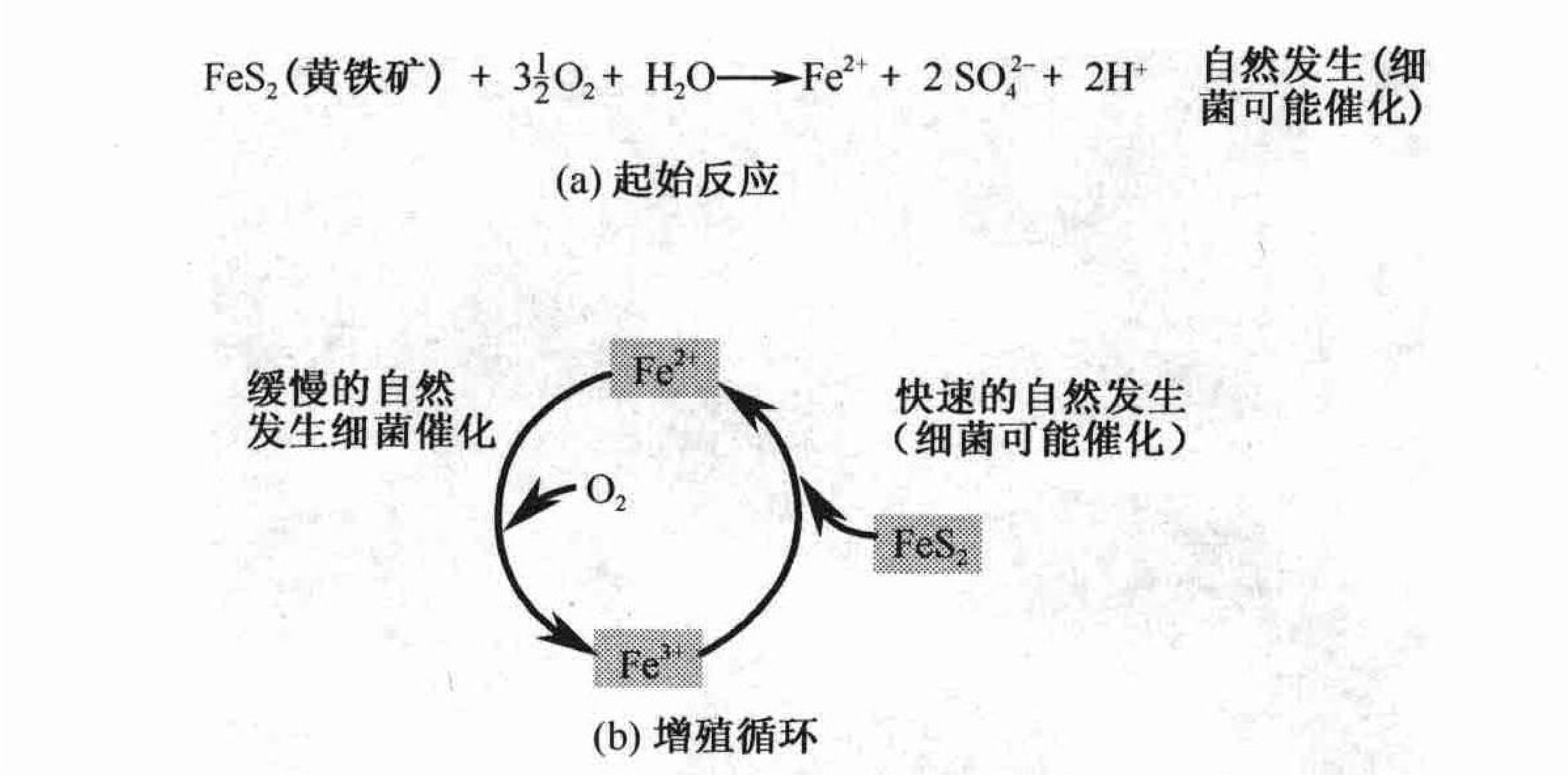


图 19.33　铁氧化细菌在黄铁矿氧化中的作用。(a) 主要的非生物起始反应；(b) 增殖循环，包括有生命的和无生命的组分。

此黄铁矿以一个持续进行、快速增加的速率进行氧化，这被称为增殖循环（propagation cycle），在图 19.33 中做了描述。在中性条件下，由细菌产生的亚铁浸出后，被地下水带入周围的小河中，由于通风的排水道中有氧，所以亚铁的细菌氧化作用发生在这些流出物中，形成不溶性的高铁沉淀。

酸性矿排出水

硫化物矿石的细菌氧化是酸性矿排出水（acid mine drainage）的主要因素，是煤矿地区的一个环境问题（图 19.34）。酸性矿的水与江河和湖泊的中性水混合引起中性水质的严重下降，酸性水和不溶性金属对水生生物是有害的（图 17.28a）；另外，这种被污染的水不适合人类消费和工业利用。黄铁矿分解最终导致硫酸和亚铁的形成，并且 pH 可达到 1，形成的酸侵蚀与煤和黄铁矿相连的其他矿质，引起整个岩石结构的破坏。一种形成岩石的主要元素——铝，只溶解在低 pH 条件下，通常对水生生物具有高度毒害作用的高水平 Al^{3+} 存在于酸性矿水中。

亚铁氧化为高铁需要氧，有助于说明酸性矿排出水是如何形成的。当煤没有被开采时，就不可能发生黄铁矿氧化，因为空气、水和细菌都不能进入其中，但当煤层暴露后（图 19.32b），很快被氧化亚铁嗜酸硫杆菌污染，氧气和水的介入，使黄铁矿氧化，然后，形成的酸渗入周围的小河中（图 19.34）。

在酸性矿排出水扩大的地方，有古生菌铁原体属（*Ferroplasma*）强嗜酸菌株存在。这种需氧铁氧化原核生物能够在 pH 为 0，温度为 50℃条件下生长。嗜酸铁原体（*F. acidarmanus*）形成黏液细胞团吸附在铁矿沉积物的黄铁矿表面（图 19.35a）。在一个进行过特别深入研究的酸性矿排出水的地方，其位于加利福尼亚（CA）的铁山（图 19.35a），嗜酸铁原体厚的生物膜保持 pH 接近 0，该位置铁浓度约 30g/L 时，嗜酸铁原体垫不断地浸在新鲜的底物（Fe^{2+}）中，同时更多的酸可以通过前面描述的反应产生。铁原体属形态上是没有细胞壁的原核生物，并且系统进化上与热原体属（*Thermoplasma*）相关（图 19.35b 和 13.5 节）。



图 19.34 烟煤地区形成的酸性矿排出水。注意红黄色是氧化铁沉淀（图 17.28a）。

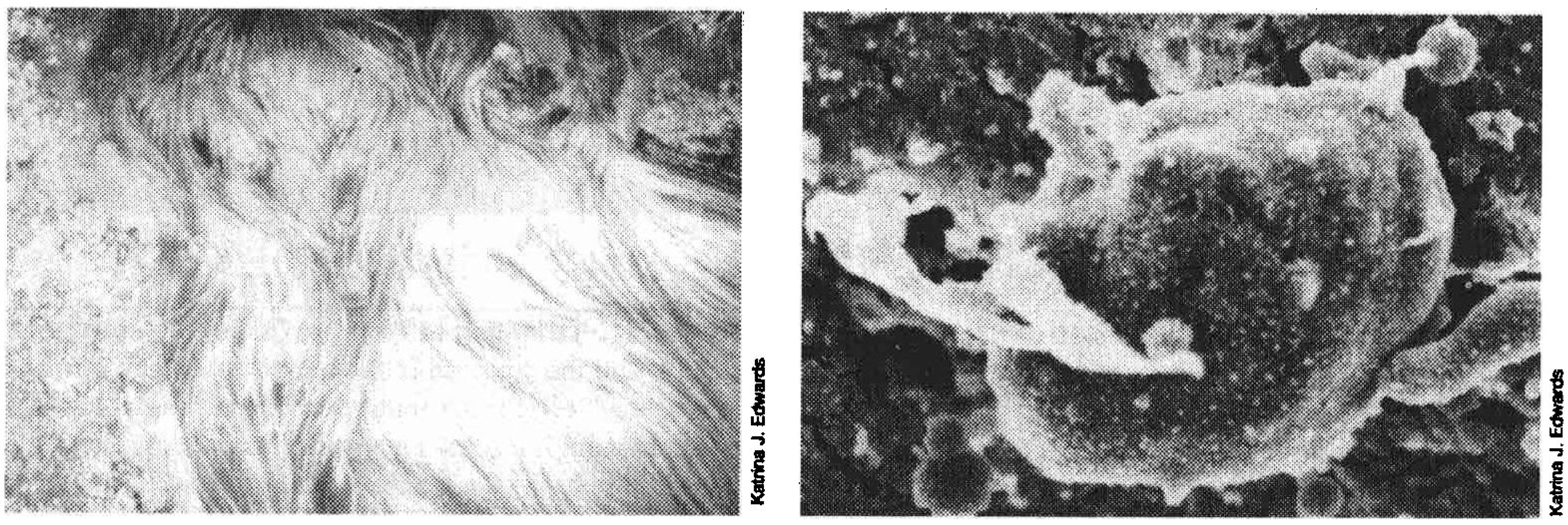


图 19.35 嗜酸铁原体（*F. acidarmanus*），是一种极端嗜酸的铁氧化古生菌，可以导致严重的酸性矿排出水。(a) 加利福尼亚（CA）铁山上生长在酸性（pH 接近 0）矿排出水流的铁原体属细胞流。(b) 矿物质中嗜酸铁原体细胞的扫描电镜照片。

概念检查

自然界中的铁主要以两个氧化状态存在：亚铁（Fe^{2+}）和高铁（Fe^{3+}）。细菌和化学转化这些金属具有地质学和生态学意义。细菌的高铁还原作用发生在无氧环境中，导致铁从木本沼泽、酸沼和其他富含铁的水生生境中的转移。细菌的亚铁氧化作用发生在大范围的低的 pH 环境中，在煤矿地区非常普遍，产生的一个典型污染称为酸性矿排出水。

◆ 矿质 $Fe(OH)_3$ 中的铁是什么氧化态（亚铁或高铁）？在 FeS 中呢？$Fe(OH)_3$ 是如何形成的？

◆ 为什么在有氧条件下 Fe^{2+} 生物氧化作用主要发生在酸性 pH 下？

Ⅵ 微生物的生物整治

微生物群体的生物地球化学潜能是巨大的，确实，微生物是地球最大的化学家。它们被用于从低级矿中提取有价值的金属（微生物浸矿），被用于清理环境。生物整治（bioremediation）是指利用微生物清除石油、有毒化学品或其他污染物。生物整治清除污染物是一种十分昂贵有效的方法，在某些情况下，这是唯一的可以使此项工作得以完成的实际方法。

19.15 微生物浸矿

由嗜酸细菌产生的酸和矿质的溶解（见 19.14 节）在金属开采中起着有益的作用。硫化物与许多金属形成高度不溶性的矿石，作为这些金属来源的许多矿是硫化物。如果矿石中的金属浓度很低，那么用传统的化学方法开采是不经济的，在这种条件下，采用微生物浸矿法（microbial leaching）。该法特别适用于铜矿，因为氧化硫化铜矿形成的硫酸铜易溶于水，世界上开采的铜，约 1/4 是通过该法获得的。

我们注意到硫化物在空气中自发氧化，大多数金属硫化物也自发氧化，但比 H_2S 或 HS^- 要慢得多。但氧化亚铁嗜酸硫杆菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）和其他金属氧化原核生物可以快速催化硫化矿石的氧化，因此，有助于增加金属的溶解性（图 19.33），图 19.36 说明了细菌存在和缺乏时氧化铜矿石的相对速率。氧化作用的敏感性在矿石中也是变化的，易氧化的那些矿石都可以采用微生物浸矿，因此硫化铁和铜矿［如黄铁矿（FeS）和蓝铜矿（CuS）］很容易被浸出，而铅和钼矿就不易浸出。

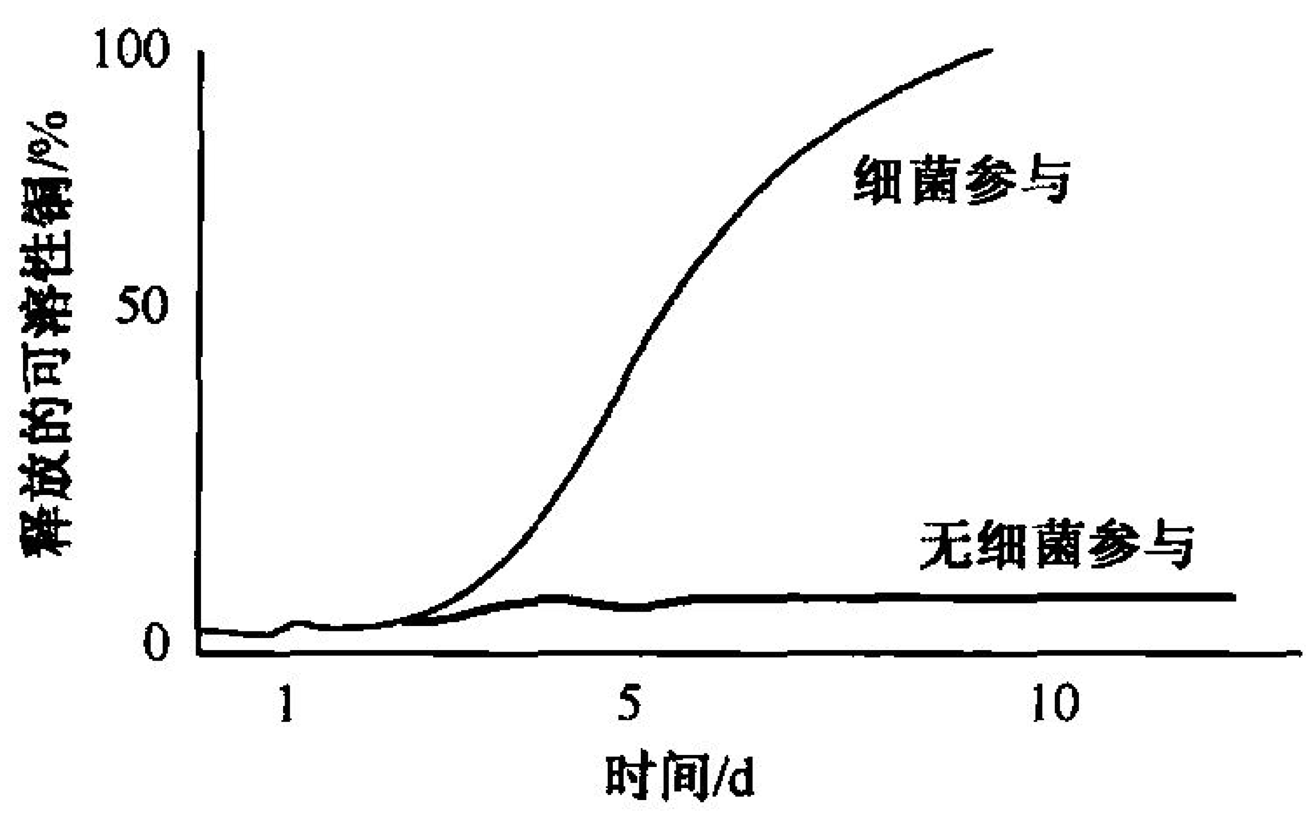


图 19.36　氧化亚铁嗜酸硫杆菌对蓝铜矿（CuS）浸出铜的影响。浸矿实验是在实验室的柱子上进行的，酸性浸出液含有细菌生长所需的无机营养，通过测定柱底部浸出液中可溶性铜来检测浸出活性，浸出液不断地再循环，保持一个基本封闭的系统。

沥滤过程

在微生物浸矿中，低等级矿或废石大量堆积成堆（浸出堆积），并且使稀硫酸溶液（pH 约为 2）从这个堆中向下渗透（图 19.37a）。然后富含被溶化的金属（称为母液）液体从大堆的底部流出（图 19.37b），收集合并运输到一个沉淀工厂（图 19.37c）。在那里所需金属被反复沉淀和精炼，然后母液再抽回到大堆的顶部，重复循环。如果需要，再加一些酸以保持较低的 pH。

细菌催化硫化矿氧化有几种机制，用蓝铜矿（covellite）的例子来说明这个机制——CuS 中的铜是+2 价的（图 19.38），氧化亚铁嗜酸硫杆菌可以氧化蓝铜矿中硫化物为 SO_4^{2-}，这个反应可以自发产生。

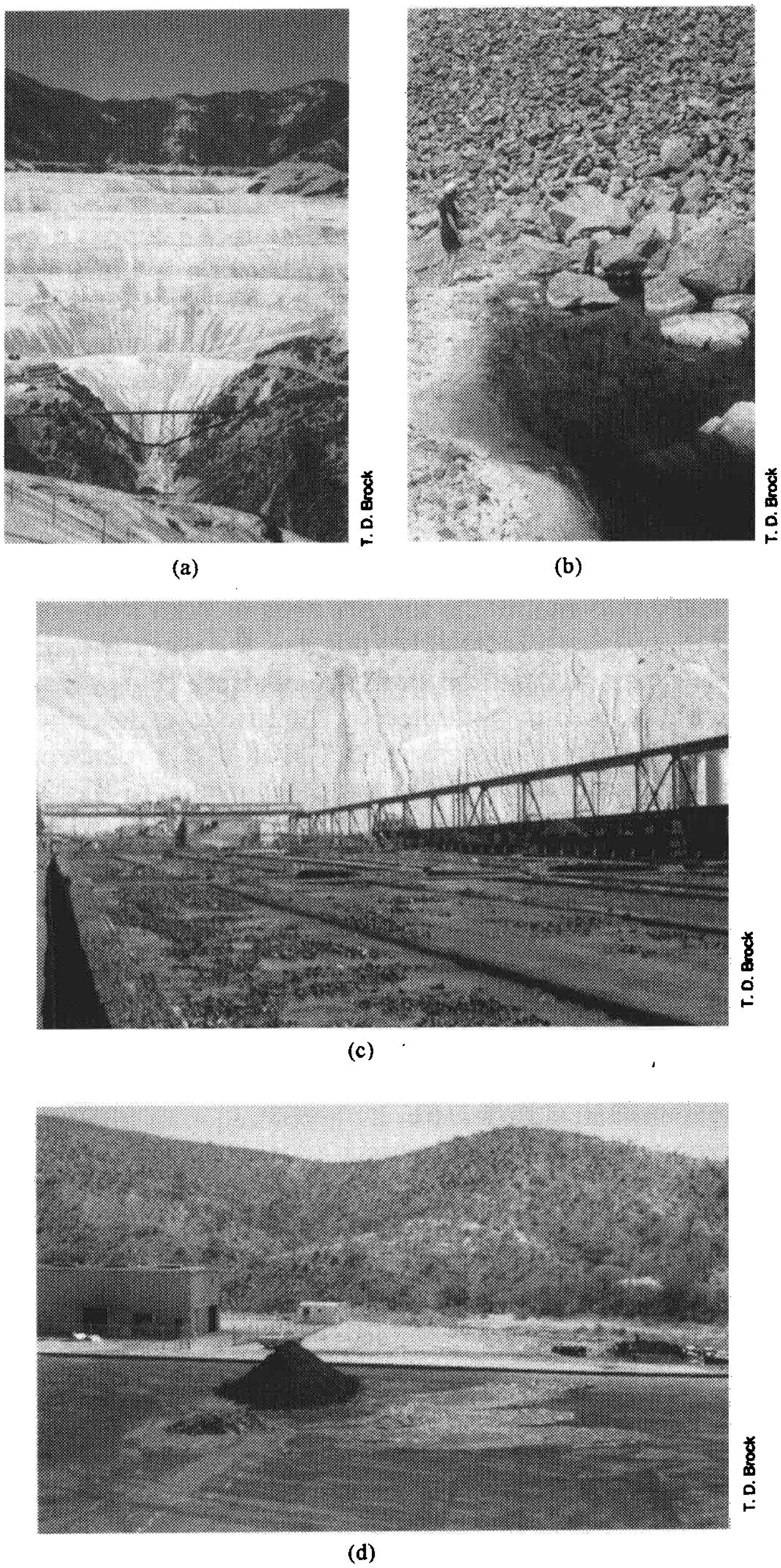


图 19.37 利用细菌浸出低等级铜矿。(a) 典型的浸矿堆积。低等级矿被压碎并大量堆积，以这种方式尽可能高地暴露表面积，酸性浸矿水的管状矿脉在堆积表面上，酸性水慢慢渗透堆积中，并从其底部流出。(b) 一个铜浸出堆中的流出物。酸性水富含可溶性的铜。(c) 在一个长的槽中，富含铜的水流经金属铁来回收可溶性的铜。(d) 从水槽中移出的一小堆回收的铜，准备进一步精炼。

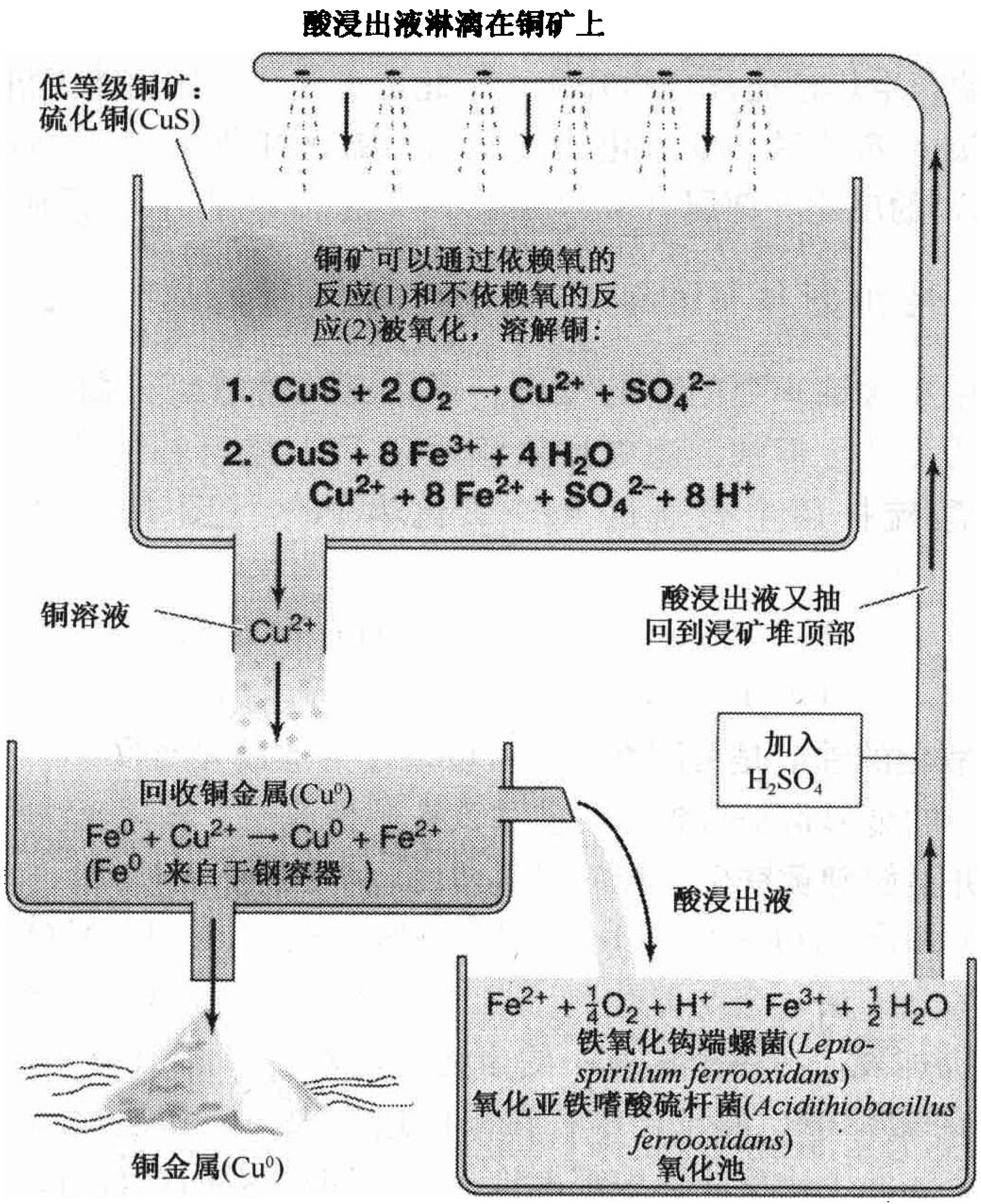


图 19.38 浸矿堆的排布和微生物浸硫化铜矿产生 Cu^0（金属铜）的反应。反应 1 既是生物反应又是化学反应；反应 2 是严格的化学反应，但是是浸出铜过程中最重要的反应。注意反应 2 对加工是如何的重要，产生的 Fe^{2+}（来自于 CuS 中硫化物氧化形成硫酸盐）被氧化亚铁嗜酸硫杆菌和铁氧化钩端螺菌氧化回 Fe^{3+}。

然而，在浸出铜过程中最重要的反应涉及高铁离子化学氧化铜矿，高铁离子是细菌氧化亚铁离子形成的（图 19.38）。在几乎所有矿中都存在黄铁矿（FeS_2），其氧化导致高铁的形成（图 19.33），高铁是硫化矿一个非常好的电子受体，利用高铁的 CuS 自发反应可导致铜的溶解，形成亚铁。重要的是，这个可以发生在浸出堆积的深部，那里的条件是无氧的。

金属回收

沉淀工厂是从浸出溶液中回收可溶性铜的地方（图 19.37c,d)，添加零价的铁，通过反应回收沥滤液中的铜，图 19.38 显示出有 Fe^{2+} 形成。然后富含铁的液体转移到一个氧化池，氧化亚铁嗜酸硫杆菌在此生长，氧化形成 Fe^{3+}，将酸加到池中降低 pH，以保持溶液中为 Fe^{3+} 形式。然后这些高铁溶液在大堆的顶部堆积，Fe^{3+} 用于氧化更多的硫化矿（图 19.38）。因此，整个沥滤过程是由细菌通过氧化 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} 而进行的。

高温对于沥滤过程是一个问题，氧化亚铁嗜酸硫杆菌是中温菌，但浸出堆内部的温度由于微生物活动产生热量通常自然升高，因此，嗜热铁氧化化能无机营养菌，如硫杆菌属（*Thiobacillus*）嗜热种、铁氧化钩端螺菌和硫化杆菌属（*Sulfobacillus*）及在更高温度(60～80℃）的硫化叶菌属（*Sulfolobus*）（见 13.9 节），在浸矿中也是重要的。

其他沥滤过程：铀和金

微生物也可用于含铀和金的矿的浸出。氧化亚铁嗜酸硫杆菌可以利用 O_2作为电子受体氧化 U^{4+} 为 U^{6+}，但铀沥滤更加依赖通过 Fe^{3+} 进行铀的化学氧化。在铜沥滤中，氧化亚铁嗜酸硫杆菌主要通过 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+}（图 19.38)。所观察到的反应是：

$$\underset{(U^{4+})}{UO_2} + \underset{(Fe^{3+})}{Fe_2(SO_4)_3} \rightarrow \underset{(U^{6+})}{UO_2SO_4} + \underset{(Fe^{2+})}{2FeSO_4}$$

不同于 UO_2，被氧化的铀矿是可溶性的，可以通过其他过程回收。

发现自然界中的金通常是与含砷的矿和黄铁矿相连的。氧化亚铁嗜酸硫杆菌及其相关的菌可以侵袭并溶解砷黄铁矿，释放出截留的金（Au)：

$$2FeAsS[Au] + 7O_2 + 2H_2O + H_2SO_4 \rightarrow Fe_2(SO_4)_3 + 2H_3AsO_4 + [Au]$$

然后通过传统的炼金方法，金与氰化物混合，不像铜沥滤发生在一个巨大的浸出堆上(图 19.37a)，金沥滤发生在一个相对小的生物反应器中（图 19.39)。这种生物沥滤可以释放大于 95%的截留金，而且，尽管在采矿过程中，砷和氰化物是有毒的残留物，但这两种物质在金沥滤生物反应器中都能被除去。砷作为高铁沉淀被除去。在金回收的后面阶段，氰化物（CN^-）通过微生物氧化成 CO_2和尿素。因此，小规模的微生物金浸矿法已经成为受欢迎的方法，来替代更加昂贵并对环境有危害的传统采金技术。这种先导过程也正用于锌、铅和镍的生物沥滤。

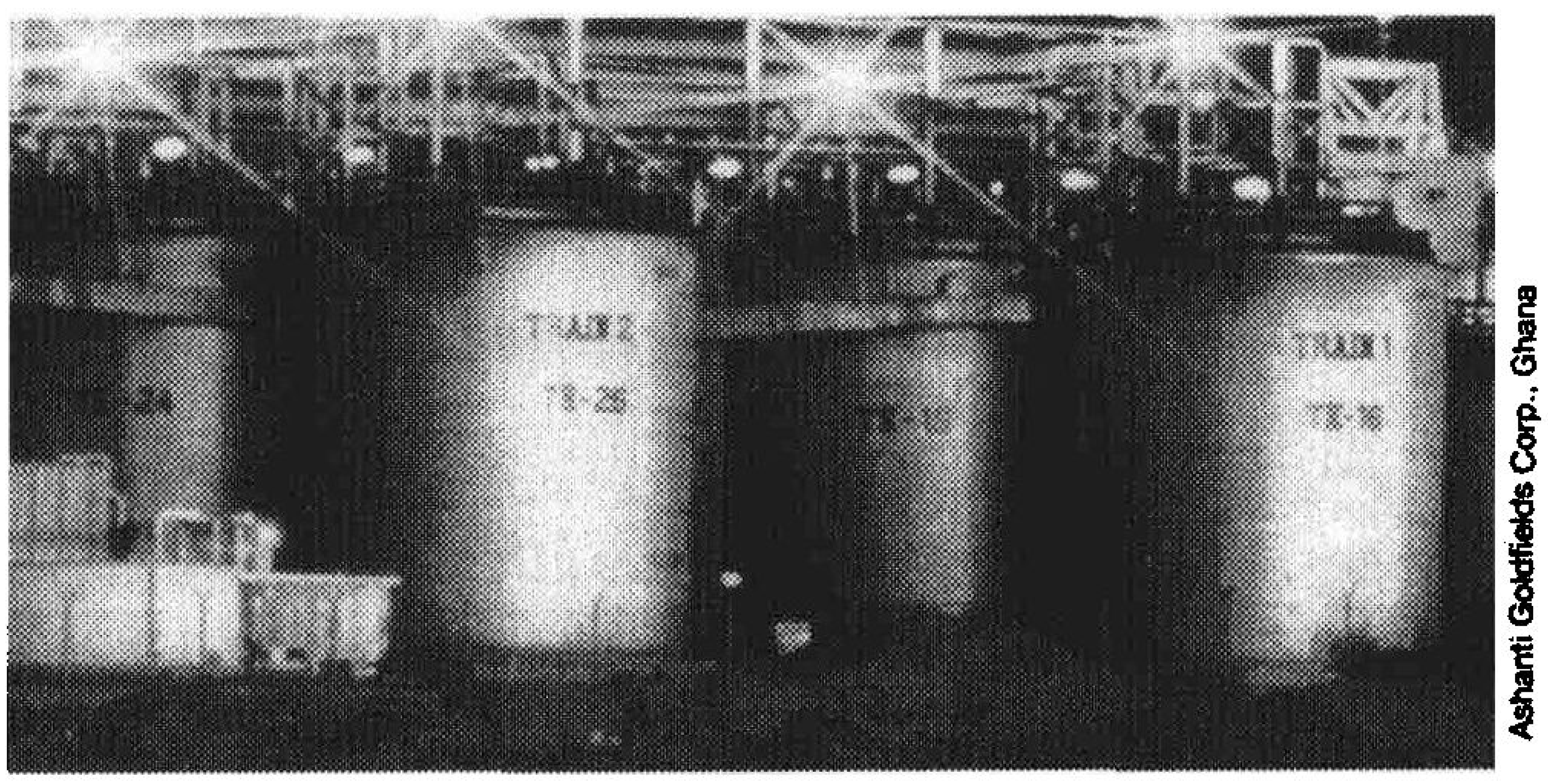


图 19.39 金生物沥滤。非洲加纳（Ghana）的阿善提(Ashanti)金厂的金沥滤罐照片。在罐内，氧化亚铁嗜酸硫杆菌、硫氧化嗜酸硫杆菌和铁氧化钩端螺菌混合物使含有金的黄铁矿/砷矿溶解，并释放金。见文中所涉及的反应。

概念检查

细菌氧化铜矿可导致铜的溶解，这个过程称为微生物浸矿。浸矿对于从低等级矿回收铜、铀和金是非常重要的。细菌氧化硫化铁矿，即黄铁矿中的铁也是微生物浸矿过程的一个重要部分，因为产生的高铁本身是矿石的一种氧化剂。

◆ 无氧条件下，CuS 是如何被氧化的？

◆ 为什么在铜矿沥滤过程中保持沥滤液酸性是非常重要的？

◆ 从金属氧化的观点来看，铜沥滤过程与金沥滤过程有何不同？

19.16 汞和重金属转化

金属以很低的含量存在于岩石、土壤、水和大气中，其中一些是细胞所需的微量元素（如铝、铜、锌、镍、钼，见 5.1 节），.但这些金属浓度过高对生物是有害的，有些金属是挥发性的；同时，这些金属也污染空气，包括汞、铅、砷、镉和硒。

许多重金属的氧化还原反应由微生物来催化，通过微生物活动，一些元素也可以转化为有机形式。从环境和微生物参与的重要性来考虑，我们主要讨论元素汞（mercury）的生物地球化学。

全球汞循环和甲基汞

尽管大多数自然环境中存在的汞含量非常低，平均为 1ng/L，汞仍广泛地用于工业生产并且是许多农药的活性组成部分。由于汞在生物组织有独特的浓缩倾向，同时它本身的巨毒性，所以汞在环境中有相当大的重要性。例如，汞矿的开采和化石燃料的燃烧

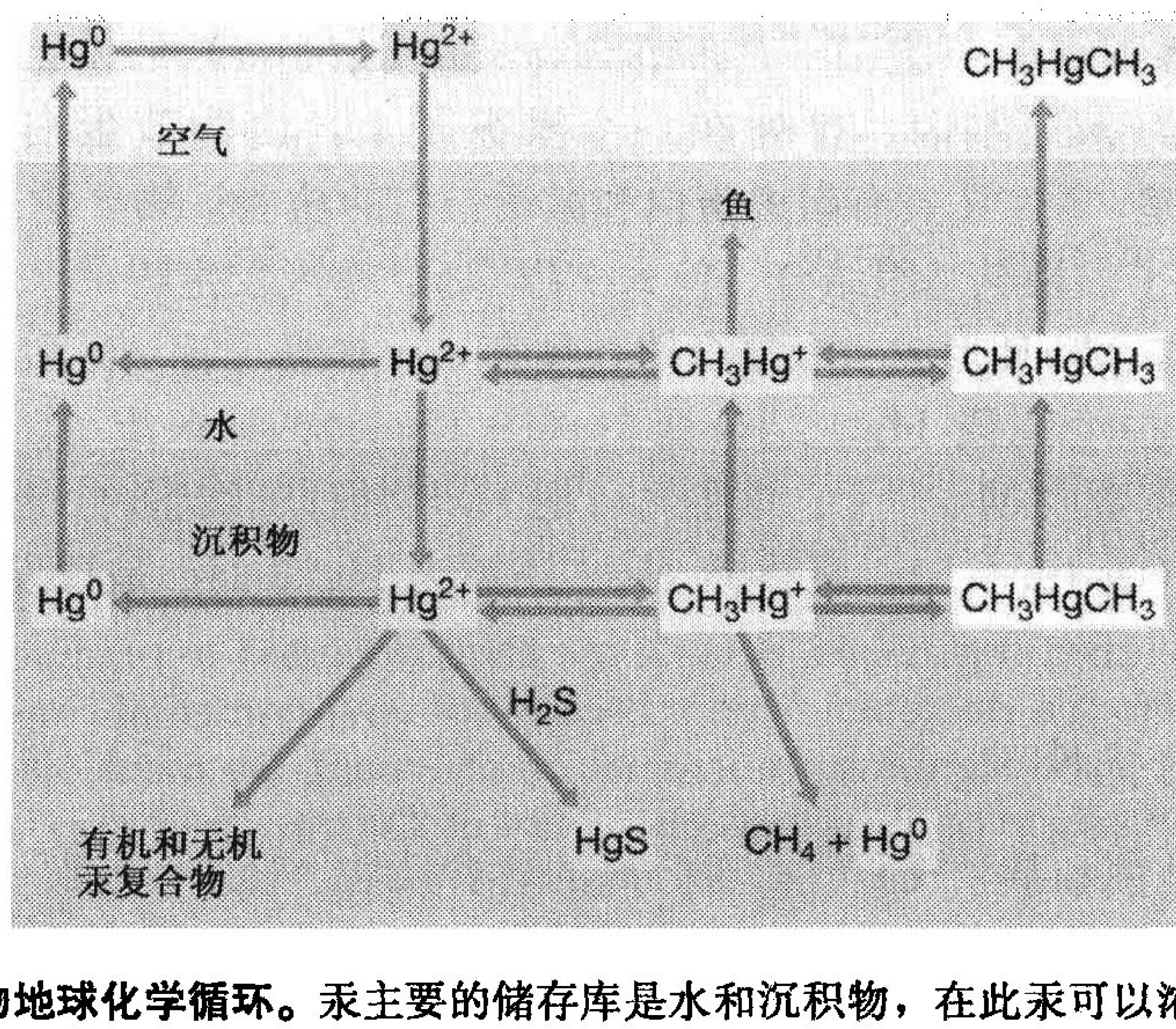


图 19.40 汞的生物地球化学循环。汞主要的储存库是水和沉积物，在此汞可以浓缩于动物组织或以 HgS 沉淀出来，在水生环境中经常发现的不同形式的汞，用不同颜色显示出来。

每年释放到环境中的汞约为 40 000t，相当大的量是由天然的地球化学过程释放的。汞也是电子工业特别是电池和电线生产、化学工业和城市废物的燃烧的副产物。

汞在大气中的主要形式是元素汞（Hg^0），是挥发性的，光化学氧化为汞离子（Hg^{2+}），因此，进入水生环境中的大多数汞是 Hg^{2+}（图 19.40）。汞离子很容易吸附到颗粒物质上，在此可被微生物代谢。微生物活动导致汞的甲基化作用（methylation），产生甲基汞 CH_3Hg^+（methylmercury，图 19.40）。在代谢过程中，汞的甲基化作用是由甲基-B_{12}提供甲基的。甲基汞是特别有毒的，因为它可以通过皮肤被吸收；此外，它是可溶性的，可以在水生食物链特别是鱼中浓缩，甲基汞可以被微生物进一步甲基化产生挥发性的化合物二甲基汞（$CH_3—Hg—CH_3$）。

甲基汞和二甲基汞在动物组织中特别是肌肉中积累。甲基汞的毒性比 Hg^0 或 Hg^{2+} 高 100 倍，在鱼中富集，是一种强烈的神经毒素。因此，甲基汞是一种主要的环境毒素，它的积累是淡水湖中非常重要的问题。从人类所食用的鱼中可以发现甲基汞浓度的增加，汞可以引起人或动物肝脏和肾脏的损伤。

全球范围内还发生几种其他的汞转化反应，包括涉及硫酸盐还原细菌（$H_2S+Hg^{2+}\rightarrow HgS$）和产甲烷菌（$CH_3Hg^+\rightarrow CH_4+Hg^0$）的反应（图 19.40）。HgS 溶解度很低，因此在无氧硫酸盐还原沉积物中，大多数汞是 HgS，但是在通气情况下，也可以发生 HgS 的氧化，主要是硫杆菌属导致形成 Hg^{2+} 和 SO_4^{2-}，最终形成甲基汞。

汞抗性

高浓度的 Hg^{2+} 和 CH_3Hg^+ 不仅毒害高等生物而且毒害微生物。但几种微生物可以将汞有毒的形式通过生物转化为无毒的形式，在具有汞抗性的革兰氏阴性菌中，有一种与 NADPH 相连的酶称为汞还原酶（mercuric reductase）还原 Hg^{2+} 为 Hg^0，这个反应产生的 Hg^0 是挥发性的，但对人和微生物是无毒的，细菌转化 Hg^{2+} 为 Hg^0，然后使更多的 CH_3Hg^+ 转化为 Hg^{2+}（图 19.41）。

革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）的汞抗性基因位于质粒上，这些基因称为 *mer* 基因，排列在一个操纵子上，由调节蛋白 MerR 控制（图 19.41a)。有趣的是，MerR 具有阻遏蛋白和激活蛋白的功能（第 8 章），在无 Hg^{2+} 时，merR 与 *mer* 操纵子的操纵基因结合，使 *merTPCAD* 基因发生转录（图 19.41a）；但当 Hg^{2+} 存在时，它与 MerR 形成一个复合体，具有 *mer* 操纵子转录激活蛋白的功能。

MerP 蛋白是一个周质 Hg^{2+} 结合蛋白（图 19.41b），MerP 蛋白结合 Hg^{2+}，把 Hg^{2+} 转移到一个膜蛋白 MerT 上。该蛋白可把 Hg^{2+} 转移到细胞内，在汞还原酶的作用下进行还原反应（图 19.41b），最终使 Hg^{2+} 还原为 Hg^0，Hg^0 是挥发性的，从细胞中释放出来（图 19.41b）。

对其他重金属的抗性

从革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中分离的各种质粒（见 10.8 节）编码重金属抗性基因，某些抗生素抗性质粒也含有抗汞和砷的基因，其他质粒只编码重金属抗性基因，特别是多抗性基因。对特定金属抗性的机制不同，例如，对砷酸盐和镉抗性是由于酶的活性，释放与蛋白质结合的砷酸盐或镉离子，阻止金属对蛋白质的变性。其他抗性可涉

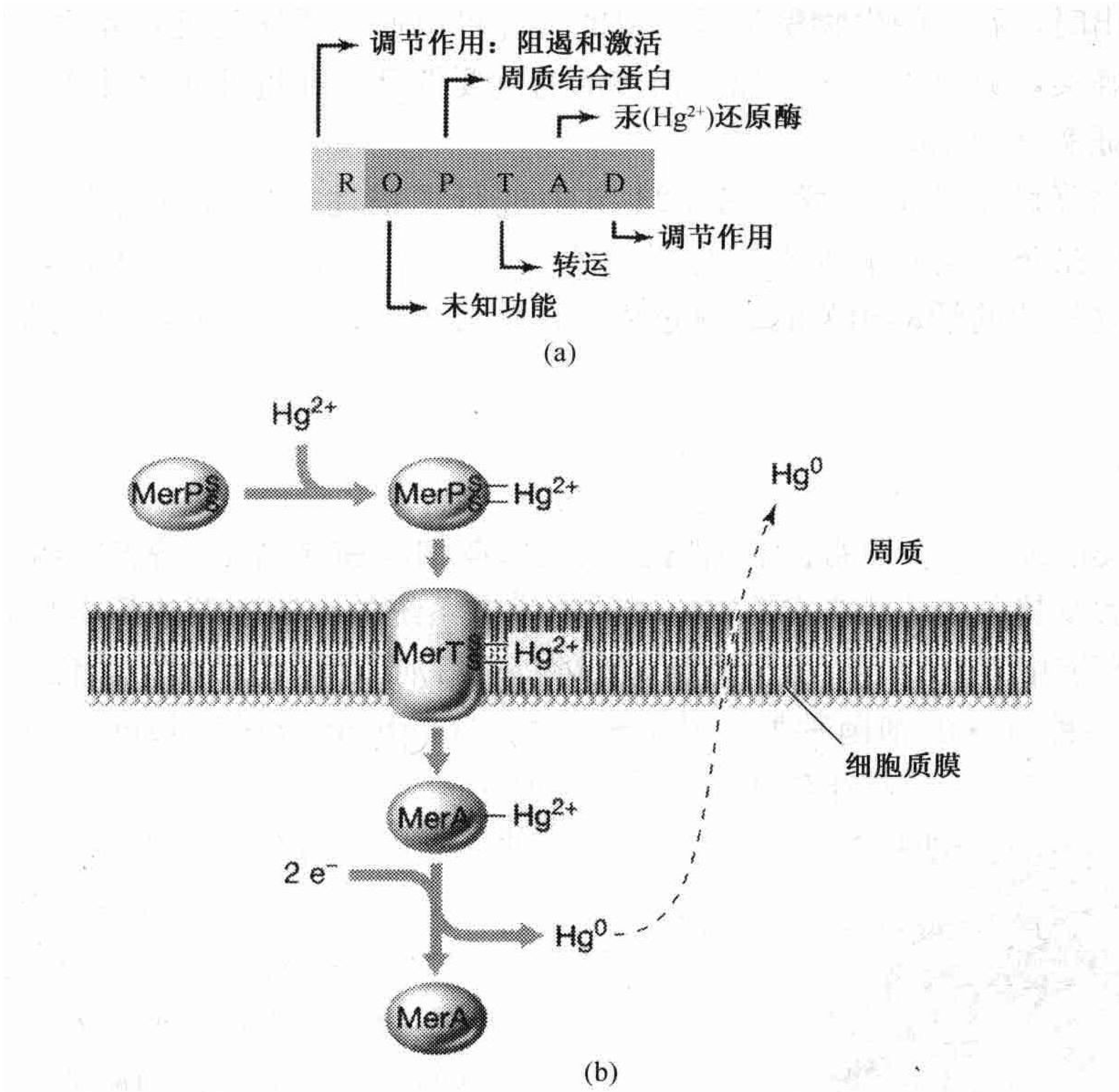


图 19.41　铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）中 Hg^{2+} 还原为 Hg^0 的机制。（a）*mer* 操纵子。MerR 具有阻遏功能（无 Hg^{2+} 时）或转录激活功能（存在 Hg^{2+} 时）。（b）Hg^{2+} 的转移和还原。Hg^{2+} 结合在 MerP 和 MerT 蛋白半胱氨酸的残基上。

及氧化还原变化（图 19.41）。对高浓度的几种金属具有天然抗性的细菌通常含有编码抗性基因的多种质粒，这种多抗性生物常存在于金属加工业的废水中或采矿业中，在那里重金属随着铁或铜一起浸出（见 19.15 节）。

概念检查

汞的一种主要有毒形式是甲基汞，后者可以产生 Hg^{2+}，并被细菌还原为 Hg^0。细菌抗重金属毒性的能力是由于存在特定质粒，它编码能够解毒或泵出金属的酶。

◆ 哪种形式的汞对生物最有害？

◆ 细菌是如何解毒汞的？

19.17 石油生物降解

石油是有机物丰富的来源，正因为如此，当石油与空气或水分接触时，在有氧条件下，微生物很容易分解烃。在一些情况下，如在大的储存罐中，微生物生长得不理想，

而在石油溢出时，石油的生物整治是需要的，并可以通过添加无机营养物，提高生物整治的能力。确实，原核生物对石油生物整治的重要性已经在近几年来几次主要原油的溢出上得到了证实（图 19.43）。

石油生物降解的生物化学在 17.23 节中进行了描述，那时我们重点强调加氧酶（oxygenase）在介导氧原子进入烃时所起的重要作用（图 17.55），因此，这里我们将重点讨论与这种酶的活动相关的好氧过程，在该过程中，自然界中烃氧化在量上起着很大的作用。

烃分解作用

许多种类的细菌、少数霉菌和酵母菌及某些蓝细菌和绿藻在有氧时能够氧化石油产物。由于人类及其自然活动造成的水生和陆地生态系统的小范围石油污染是非常普遍的，因此在这些环境中存在的各种微生物群落能够利用石油作为电子供体。最简单的烃——甲烷是只能被一种特殊的细菌种群甲胺氮营养菌（methanotrophic bacterium）分解（见 12.6 节和 17.24 节），这些生物不能在高烃上生长。

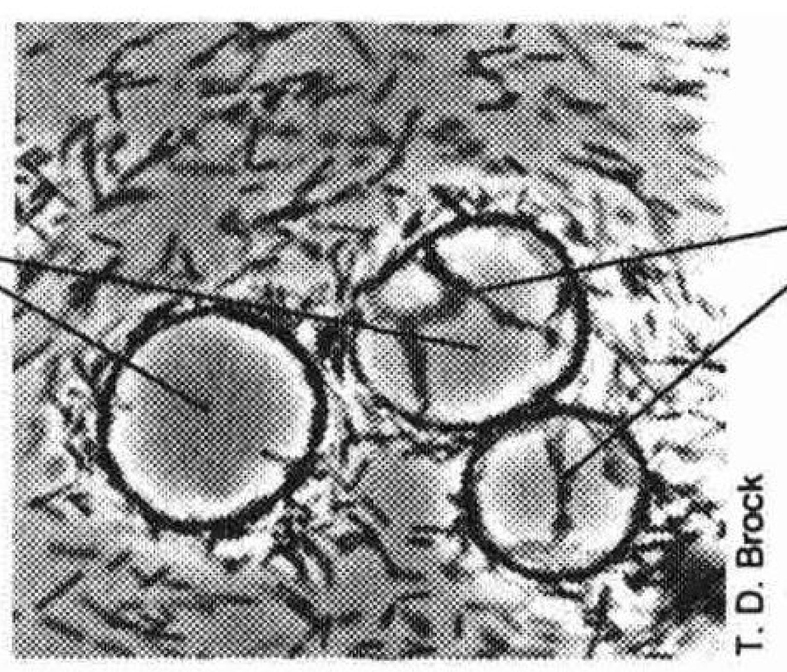


图 19.42 与石油小滴相连的烃氧化细菌。 细菌在油-水界面上，但不在小滴内大量聚积。

石油氧化微生物在石油油膜内和油花上快速生长，如果温度和无机营养（主要是氮和磷）是足够的，那么石油氧化活动将更加广泛（图 19.43）。因为油不溶于水，密度小，它漂浮在水的表面形成油花。石油氧化细菌通常大量地附着在不溶性的油小滴上（图 19.42），这些细菌最终分解油，并使油层分散。

微生物生物整治石油（图 19.43）是将石油氧化为 CO_2，在大片的石油溢出中，挥发性的烃很快蒸发，剩下中长链脂族和芳香族成分将由清除物或微生物来处理。通过提高生物整治能力，在石油溢出后，很快石油氧化细菌量增加 10^3～10^6倍。

用放射性同位素烃作为示踪物或测定呼吸作用的 O_2吸收实验表明，在理想条件下，石油溢出 1 年内，石油中 80%以上的不挥发性成分被细菌氧化，但某些部分（如支链和多环烃）在环境中将存在更长的时间。溢出的石油进入沉积物中降解得很慢，这对水产业及其相关产业将有一个长期重要的影响，因为这些产业是依赖于非污染水来大量生产的。

界面（interface）是石油和水相遇的地方，常以一个大面积出现。例如，积累大量燃料的储存罐没有一点水分是不可能的，因为水在石油的下面形成一层，因此，汽油和原油的储存罐（图 19.44）是烃氧化微生物潜在的生境。如果水中存在足够的硫酸盐，那么硫酸盐还原菌可以在储存罐中生长，在无氧条件下消耗烃（见 17.23 节），产生的硫化物（H_2S）是高度腐蚀性的，引起储存罐的凹陷和泄漏。

石油生产

尽管微生物降解石油十分广泛，但微生物也可以产生烃，特别是在一些绿藻中。例

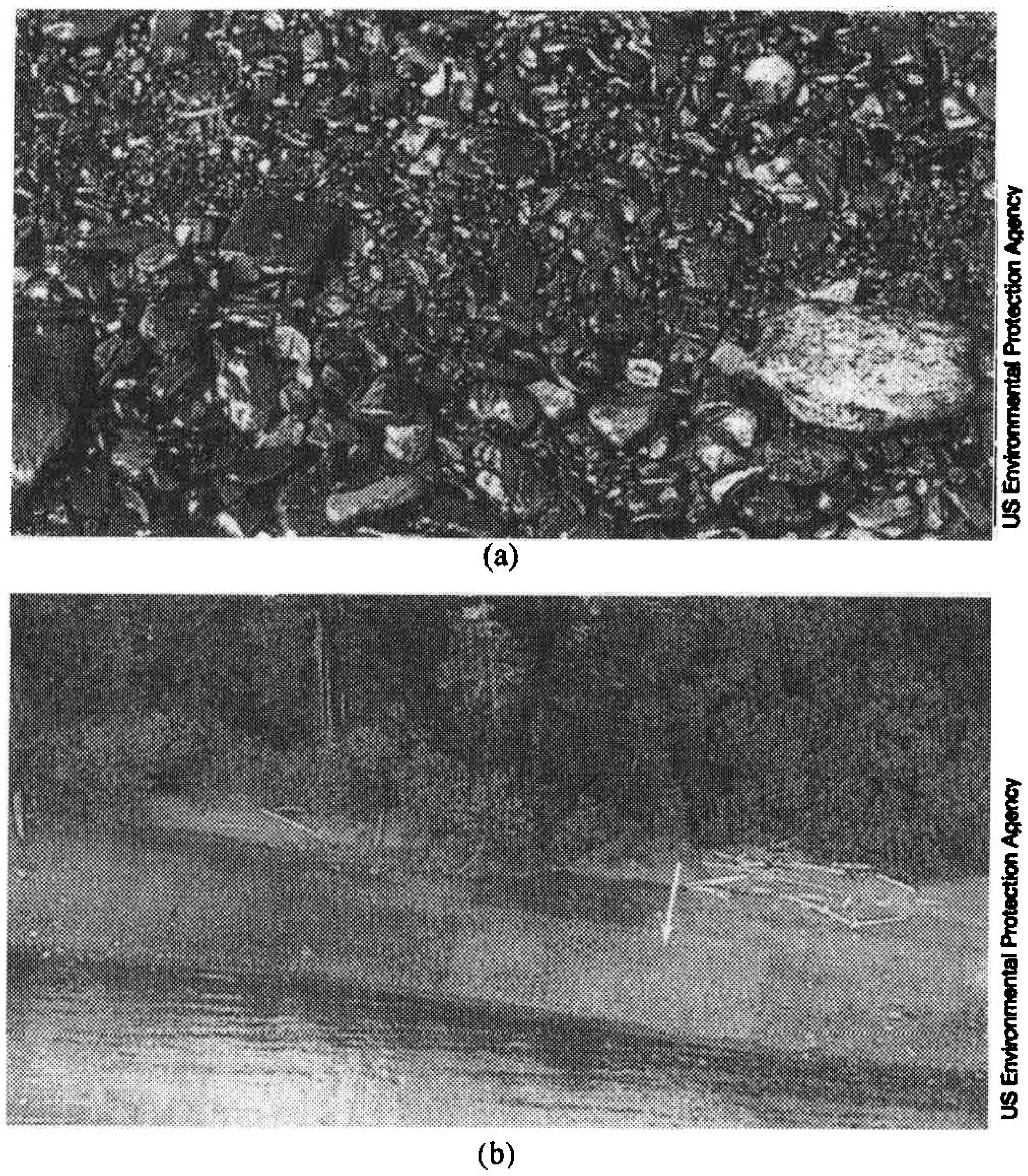


图 19.43　海洋环境中大量石油溢出后的环境结果和生物整治效应。（a）1989 年，阿拉斯加海由于 *Exxon Valdez* 溢出石油污染的海岸。（b）中央长方形的小块地方（箭头）是用无机营养刺激微生物进行生物整治后的情况，而左边和右边的区域是没有处理的情况。

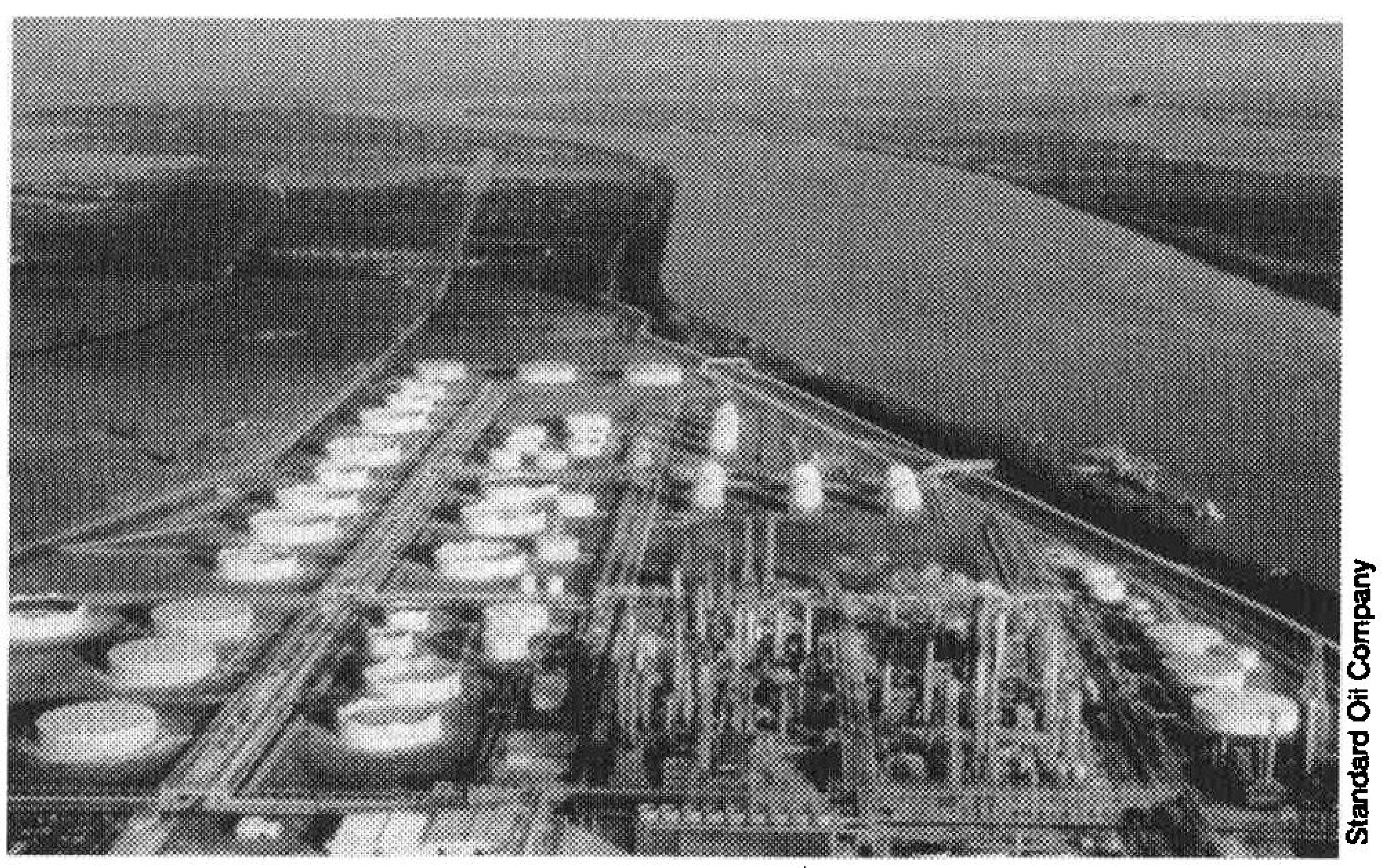


图 19.44　石油生物降解。大量燃料储存罐，微生物可以在油-水界面生长。

如，在丛粒藻（*Botryococcus braunii*）的菌落中，其生长伴随着 C_{30}～C_{36} 长链烃的分泌，具有石油的稠度（图 19.45）。丛粒藻细胞干重的 30%是石油，因此它和其他产油藻类作为石油可更新的来源。有证据表明，油岩中的某些特定类型的石油来源于远古时代生长于湖床上的绿藻，如丛粒藻。

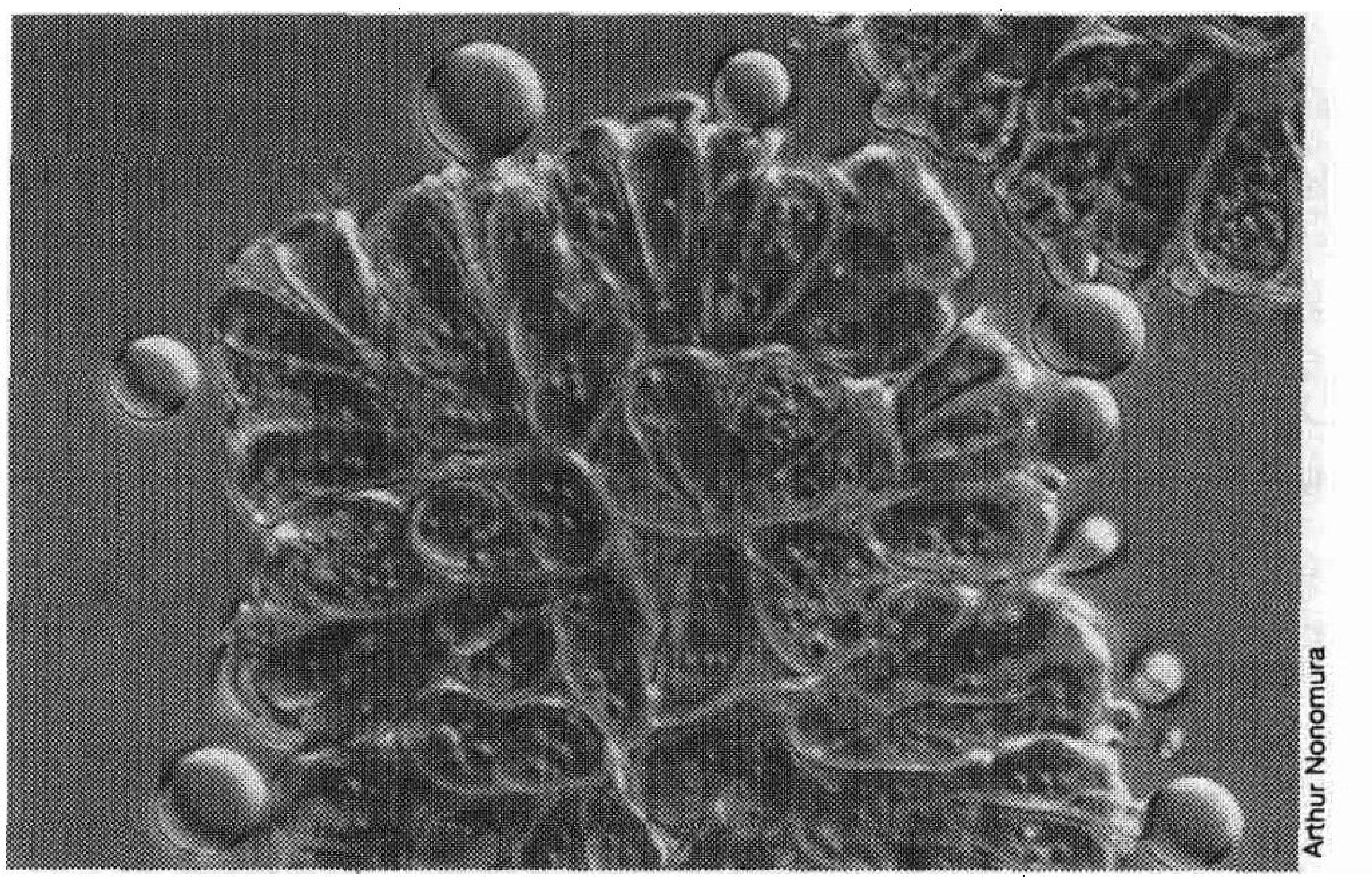


图 19.45 光养的石油生产。绿藻丛粒藻细胞的 Nomarski 干扰相差显微照片，注意在细胞的边缘由该藻产生和分泌的石油小滴。

概念检查

烃易受微生物侵蚀，烃氧化微生物用于溢出石油的生物整治，该作用是通过添入无机营养来平衡来自石油碳源的传入，一些藻类可以产生烃。

- 什么是生物整治?
- 为什么添加无机营养刺激石油降解而添加葡萄糖则不能呢?

19.18 异生素的生物降解

异生素（xenobiotic）是合成的化学产品，在自然界中不存在。异生素包括农药、多氯联苯（PCB，用于发电和相关工业）、军火、染料和氯化溶剂及其他物品。许多异生素在结构上与天然化合物相关，因此，可以被已经存在的能降解这些天然化合物的酶慢慢地降解。但一些异生素在化学结构上与生物体在自然环境下所遇到的任何天然物质的某个结构特别不一样时，则降解得非常缓慢。这里，我们主要以农药作为微生物降解的一个潜在实例来讲述。

农药分解代谢

最广泛分布的异生素是农药（pesticide），它通常是有害废物的组分。市场上销售的 1000 多种农药是用于化学病虫害防治，包括除草剂（herbicide）、杀虫剂（insecticide）和杀真菌剂（fungicide）。农药有不同的化学类型，包括含氯化合物、芳香环化合物、含氮和含磷化合物等（图 19.46），其中一部分物质可作为某些土壤微生物的碳源和电子供体，而另一些则不能。

如果微生物侵蚀一种物质，那么这种物质最终会从土壤中消失，这样可避免有害化

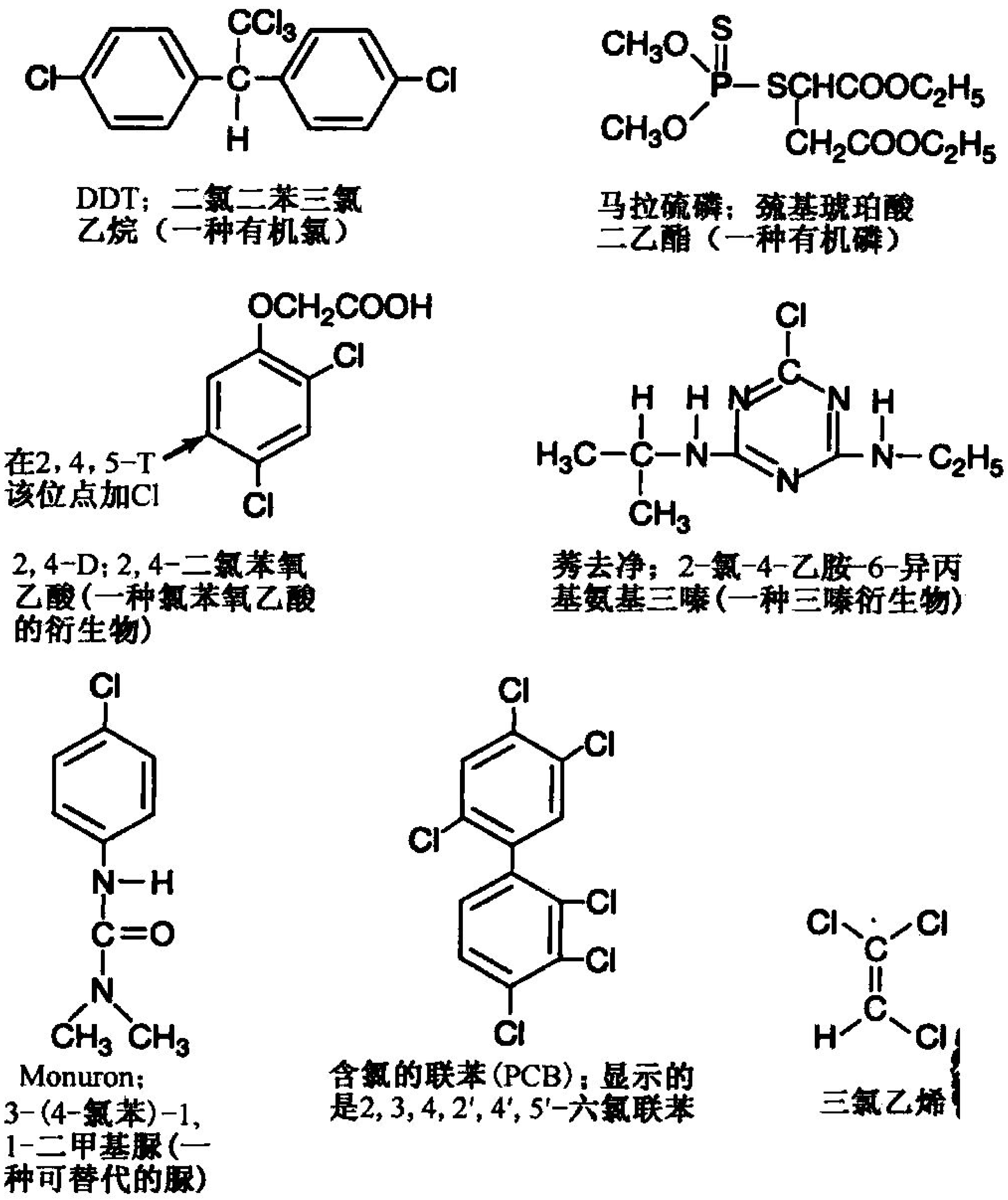


图 19.46　异生素化合物的例子。 尽管这些化合物在自然中从不存在，但破坏这些化合物的各种微生物是存在的（见表 19.7 中持久性数据和图 19.47 中 2,4,5-T 生物降解的途径）。

合物的积累，土壤中的这种降解是最理想的。但正如表 19.7 所显示的，即使是最相近的化合物，它们的降解力也可能有显著的不同。因此，一些化合物多年相对不变，而另一些仅在数周或数月就明显地被降解。

表 19.7　除草剂和杀虫剂在土壤中的持久性

物质	消失 75%～100%所需时间
氯化杀虫剂	
滴滴涕[(DTT) 1,1,1-三氯-2,2-二（p-氯苯）乙烷][a]	4 年
艾氏剂（aldrin）	3 年
氯丹（chlordane）	5 年
七氯（heptachlor）	2 年
林丹（lindane）	3 年
有机磷酸盐杀虫剂	
地亚农（diazinon）	12 周
马拉硫磷（malathion）[a]	1 周
对硫磷（parathion）	1 周
除草剂	
2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)	4 周

续表

物质	消失 75%～100%所需时间
除草剂	
2,4,5-T(2,4,5-三氯苯氧乙酸)	20 周
茅草枯（dalapon）	8 周
莠去净（atrazine）[a]	40 周
西玛三嗪（simazine）	48 周
扑灭津（敌稗）（propazine）	1.5 年

a. 其结构显示在图 19.46。

异生素相对持续性速率仅是约数，因为各种环境因素，如温度、pH、通气和土壤中有机物成分都影响分解作用。一些含氯的杀虫剂（图 19.46）是不能被破坏的，以至于能在自然界存留 10 年以上。但农药从生态系统中完全消失并不一定意味着它是由微生物降解了；农药的消失也可以通过蒸发作用、滤过或自发的化学降解。生物利用率（bioavailability）从某种程度上也控制微生物对异生素化合物的分解。许多异生素是十分疏水的，因此在水中不易溶解，这些物质对土壤和沉积物中有机物和黏土的吸收阻碍了其向生物体的进入，通常添加表面活性剂和乳化剂以提高生物利用率，最终生物降解异生素化合物。

许多生物能代谢农药和除草剂，包括细菌和真菌的许多属。一些农药可作为碳源和能源，完全被氧化为 CO_2，但另一些化合物只能由微生物稍稍代谢或根本无法代谢。如果存在一些其他有机物作为主要能源时，某些化合物可以被部分或全部降解，这种现象称为共代谢（cometabolism）或联合氧化（cooxidation）。但如果只是局部破坏时，微生物降解农药的产物有时甚至比最初的化合物毒性更大。

还原脱氯作用

第 17 章中我们所讨论的一种厌氧呼吸方式称还原脱氯作用（reductive dechlorination），在这个过程中，含氯的有机化合物在无氧条件下作为最终的电子受体（见 17.18 节）。一种研究还原脱氯作用的实验室模型是通过细菌脱硫念珠菌属（*Desulfomonile*）将氯苯甲酸酯还原为苯甲酸酯：

$$C_7H_4O_2Cl^- + 2H \rightarrow C_7H_5O_2^- + HCl$$

从生物整治的观点来看，其他含氯化合物在生态学上比氯苯甲酸酯更重要，如还原脱氯作用可以发生在以下化合物中：二氯、三氯、四氯（高氯）乙烯、氯仿、二氯甲烷、某些多氯联苯（PCB；图 19.46）和各种溴化物及氟化物，这些有毒化合物可广泛地用作工业溶剂、脱脂试剂和电子变压器中的绝缘体，有些（特别是三氯乙烯，图 19.46）是与癌症相连的。它们通过偶然的溢出或从储存罐或丢弃的电子变压器中慢慢地泄漏而进入环境中，最终转移到地下水中，在美国经常可以在污染的地下水中检测到这些化合物。

几个属的还原脱氯菌（见 17.18 节）可以将各种不同的含氯化合物转化为无毒的代谢物，目前最令人感兴趣的是刺激还原脱氯原核生物的生物整治活动作为一种策略去除无氧环境中的这些高度毒性的化合物。

需氧脱氯作用

含氯化合物的需氧脱氯作用（aerobic dechlorination）也是可能的（图 19.47），但在这里，氧参与的生物化学机制可以发挥作用。在这种条件下，含氯芳香族化合物的降解通过加氧酶方式进行（见 17.22 节）。例如，农药2,4,5-T 的需氧降解，脱氯后，双加氧酶打断了芳香环，产生的化合物可以通过三羧酸循环被代谢（图 19.47b）。

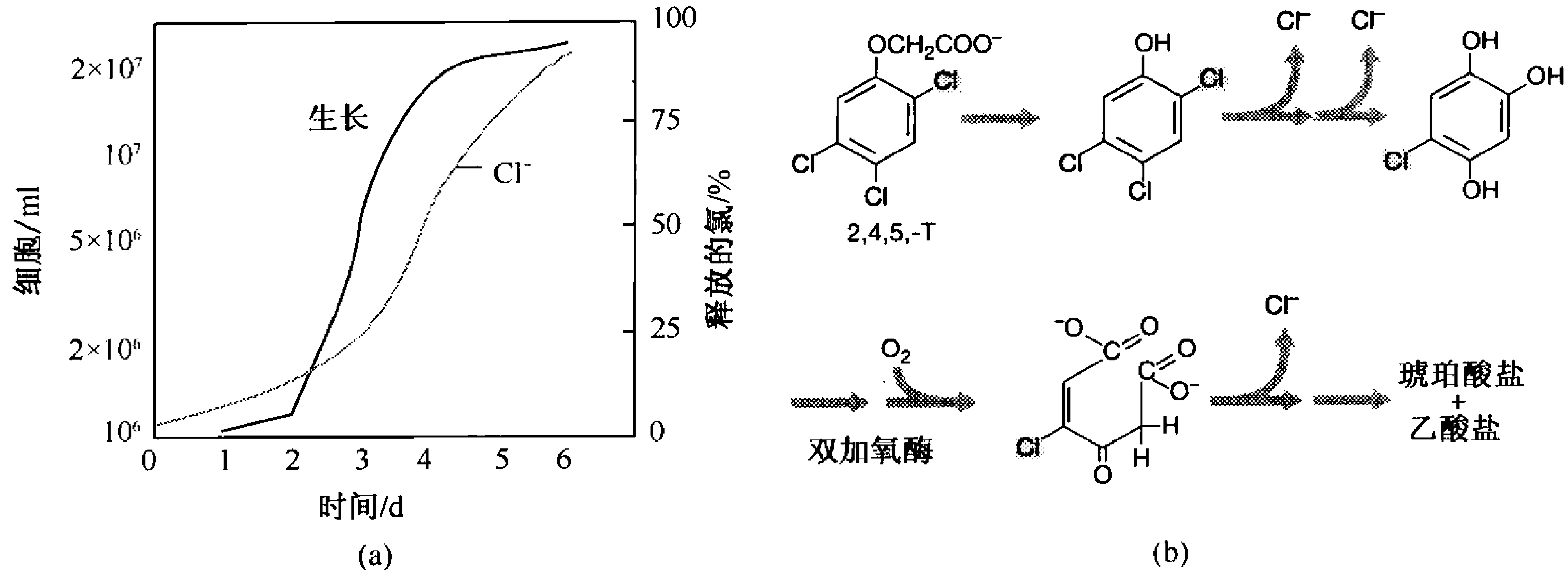


图 19.47 除草剂2,4,5-T 的生物降解。（a）洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）的生长以2,4,5-T 作为唯一的碳源和能源，从自然界中富集的该菌可以作为一个恒化器使除草剂处于较低浓度，这里的生长是需氧的，每升2,4,5-T 可生长 1.5g 菌体（1.5g/L 2,4,5-T），从该分子释放的氯可代表生物降解。（b）2,4,5-T 需氧生物降解的途径。双加氧酶作用机制在第 17 章已讨论（图 17.56c）。几种细菌在无氧条件下可以分解芳香族化合物，但利用的机制与这里所显示的是非常不同的（图 17.57）。

尽管需氧分解含氯异生素无疑具有生态学意义，但是还原脱氯作用仍具有特殊的环境意义，因为在自然界和生物化学制约的条件下（图 19.47b），厌氧条件在受污染的微生物生境中能够快速发展，这就使得需氧生物以另一种方式降解化合物。

生物降解塑料

除了生物降解如农药和其他含氯碳氢化合物等有害废物外，环境问题的一个主要领域是对固体废物特别是塑料的处理。典型的掩埋物含有大量的纸张、食品、建筑和拆除的碎片和塑料，这些物质的降解通常是非常缓慢的，特别是在湿度和氧的缺乏等不适合微生物快速的活动条件下，另外，像塑料这种产品本质上是非常顽固的。

目前，每年塑料工业生产近 400 亿 kg 的塑料，几乎其中的一半被丢弃掩埋，塑料是各种类型的异生素多聚物，聚乙烯（polyethylene）、聚丙烯（polypropylene）、聚苯乙烯（polystyrene）是典型的例子（图 19.48），许多合成的多聚物在废物掩埋或垃圾堆中几十年都保持不变，因此这个问题激发人们去寻找生物可降解（biodegradable）的替代物——称为生物多聚物（biopolymer）来代替现在使用的合成多聚物。一些成功的例子包括光可降解的和淀粉联结的多聚物以及微生物塑料。

光生物降解塑料是多聚物，它的结构可通过紫外线辐射（阳光照射）而改变，产生变化的多聚物可被微生物攻击。源于淀粉的塑料聚合淀粉作为一个链形成第二类生物可

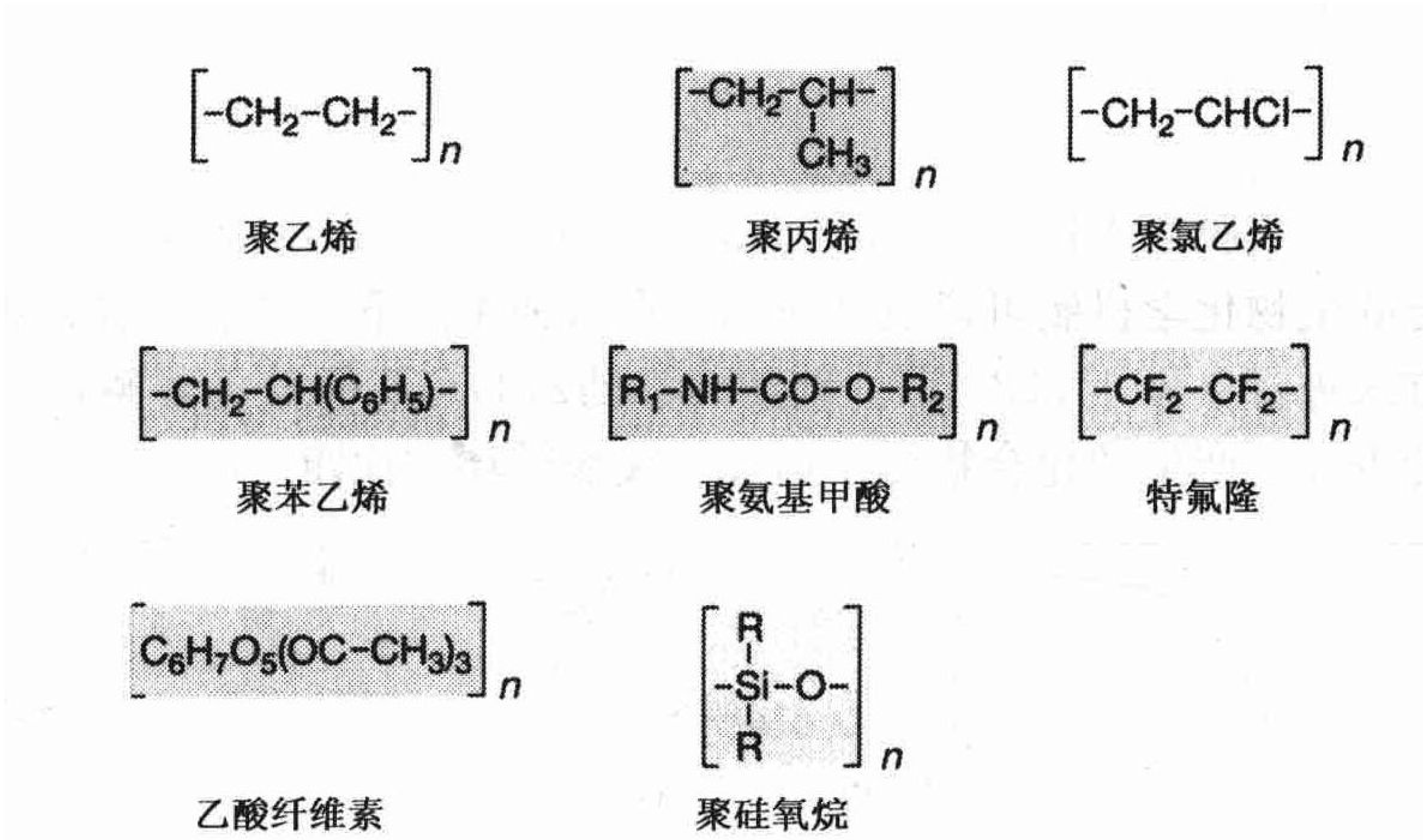
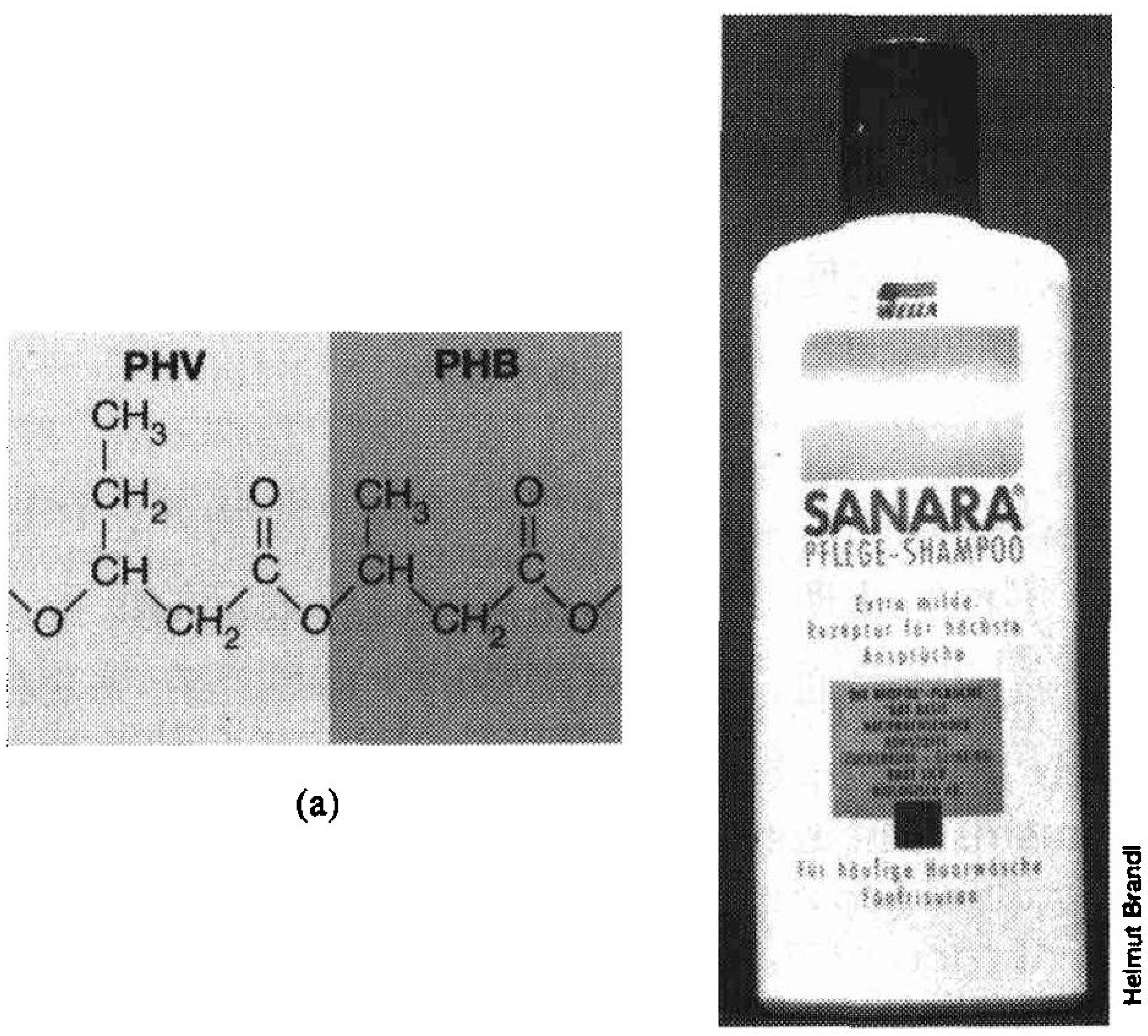


图 19.48 合成多聚物的化学结构。显示多种合成多聚物的单体结构。

降解聚合物短片段，这种设计加速了生物降解作用，因为土壤中消化淀粉的细菌可降解淀粉，释放出的多聚物片段又可由其他微生物降解。由微生物合成的塑料取决于储藏多聚物聚-β-羟基链烷酸（poly-β-hydroxyalkanoate，PHA，见 4.11 节）（图 19.49）。PHA 具有合成塑料的许多普通特性，可以以各种化学形式被生物合成，含有相同量的 PHB（poly-β-hydroxybutyrate）和 PHV（poly-β-hydroxyvalerate）的共聚物（copolymer）（图 19.49a）至今在市场上取得了巨大的成功，但因为它们成本更贵，所以源于石油的塑料目前仍然占据着塑料市场。



(a) (b)

图 19.49 细菌塑料。(a) PHV/PHB 共聚物。(b) 欧洲出售的一种洗发剂品牌，包装瓶子是由聚-β-羟基丁酸（PHB）和聚-β-羟基戊酸（PHV，见 a）共聚物制成的。因为这种材料是一种天然产物，该瓶子在有氧和无氧条件下很容易降解。

概念检查

许多化学合成的化合物如杀虫剂、除草剂和塑料（都称为异生素）完全是微生物的异源物，但它们依然可以被一种或另一种微生物降解，需氧和厌氧机制都清楚。

◆ 图 19.46 中所显示的化合物有什么共同的化学特点？

◆ 什么是还原脱氯作用？与图 19.47 中所显示的反应有何不同？

◆ 生物多聚物比合成多聚物有什么优势？

Ⅶ 微生物与植物的相互作用

我们将以微生物与植物相作用的 3 个例子来结束本章。存在许多有益的共生联合体，如地衣、菌根和豆科植物的根瘤，也有破坏性微生物可引起植物疾病。对于后者，我们这里仅考虑根癌，其原因是这种病的独特特征以及微生物的转染模式。

19.19 植物环境

作为微生物生境来说植物明显地不同于动物。与温血动物相比，植物温度在每天和全年变化都很大；与动物复杂的循环系统比较，植物的内部传导系统发育得很不完善，因此微生物在植物内的转移相对效率很低。

植物的地上部分，特别是叶子和茎容易间歇死亡，由于这个原因，许多植物在叶片上含有蜡质外被，以保持湿度并防止微生物侵袭；另一方面，根是微生物活动的主要区域，这里湿度变化小，并且养分浓度高。

根际和叶际

根际（rhizosphere）是指贴近根外部的区域（图 19.6b），这是微生物活动最活跃的区域。根表（rhizoplane）是实际的根表面。根际/根表中的细菌数量总是高于土壤中缺乏根系区域的细菌数，常常要高许多倍（图 19.50），这是因为根分泌大量糖类、氨基酸、激素和维生素，因此细菌和真菌常常在根表面形成微小的菌落。

叶际（phyllosphere）是指在高度潮湿的条件下，如在热带和温带潮湿森林中，植物叶子表面的微生物菌群非常高，包括真菌（图 19.50a）及细菌。叶子上的许多细菌可以固氮（见 17.28 节和 19.22 节），反过来，叶子提供碳水化合物和其他营养给这些细菌。

概念检查

植物主要的微生物生境包括根表/根际和叶际。

◆ 为什么对于细菌，植物的根系比远离植物的游离土壤是更具有吸引力的环境？

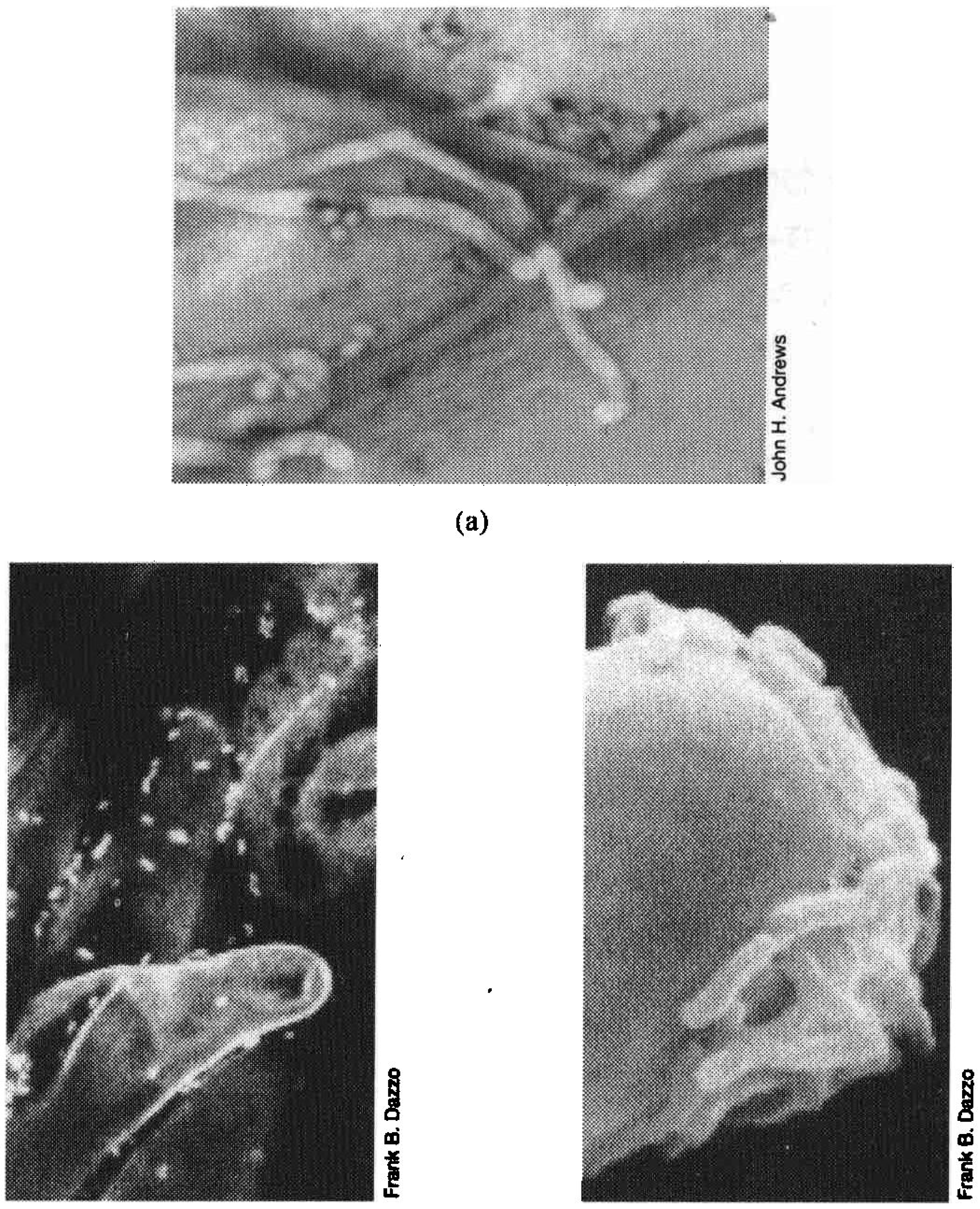
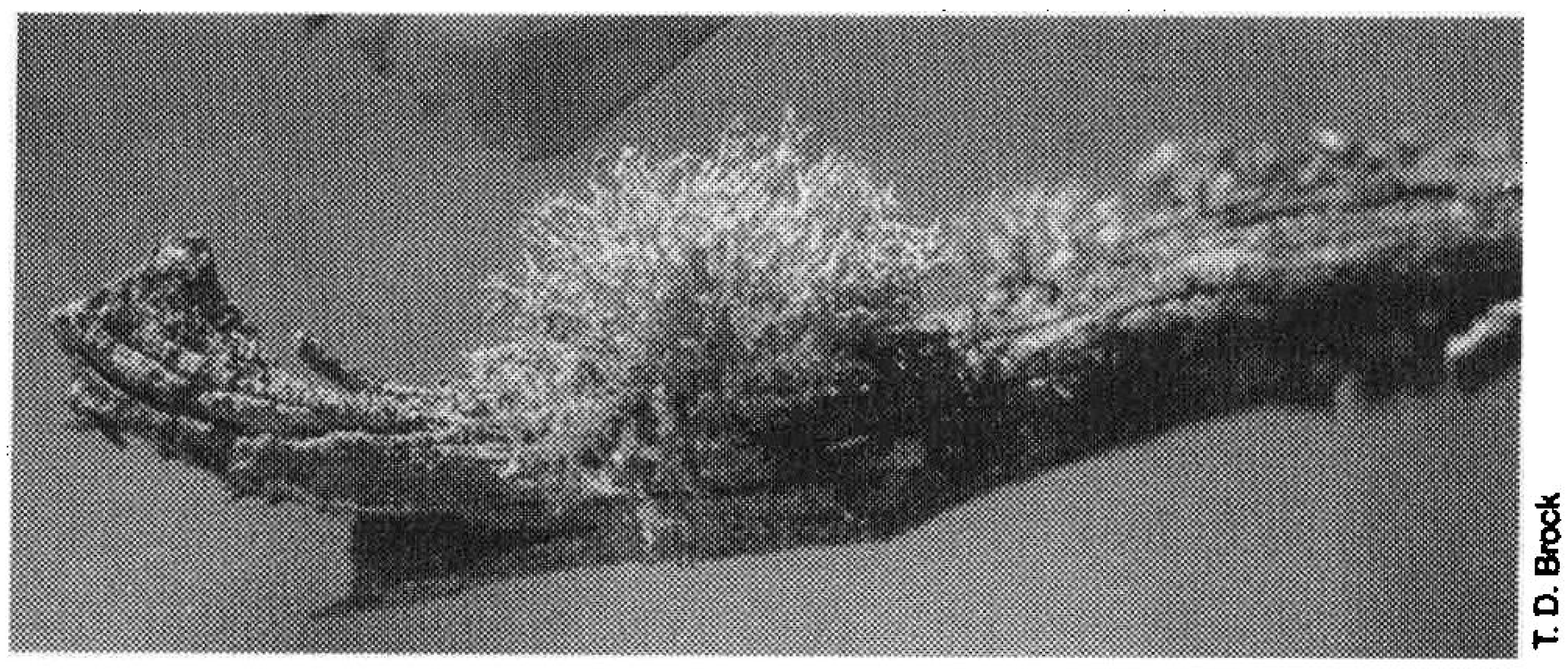


图 19.50 叶际和根际微生物生活的例子。（a）苹果叶表真菌出芽短梗霉（*Aureobasidium pullulans*）荧光显微照片。细胞经 FISH 染色，真菌菌丝和孢子显示绿色，菌丝直径约为 7μm。（b）三叶草根际/根表细菌细胞的激光扫描共聚焦显微照片。固氮细菌与豆科植物根的联合在 19.22 节讨论。（c）豌豆根瘤菌三叶草生物变种（*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*）细胞附着在三叶草发根的扫描电镜照片。（b）和（c）细菌细胞直径约为 1μm。

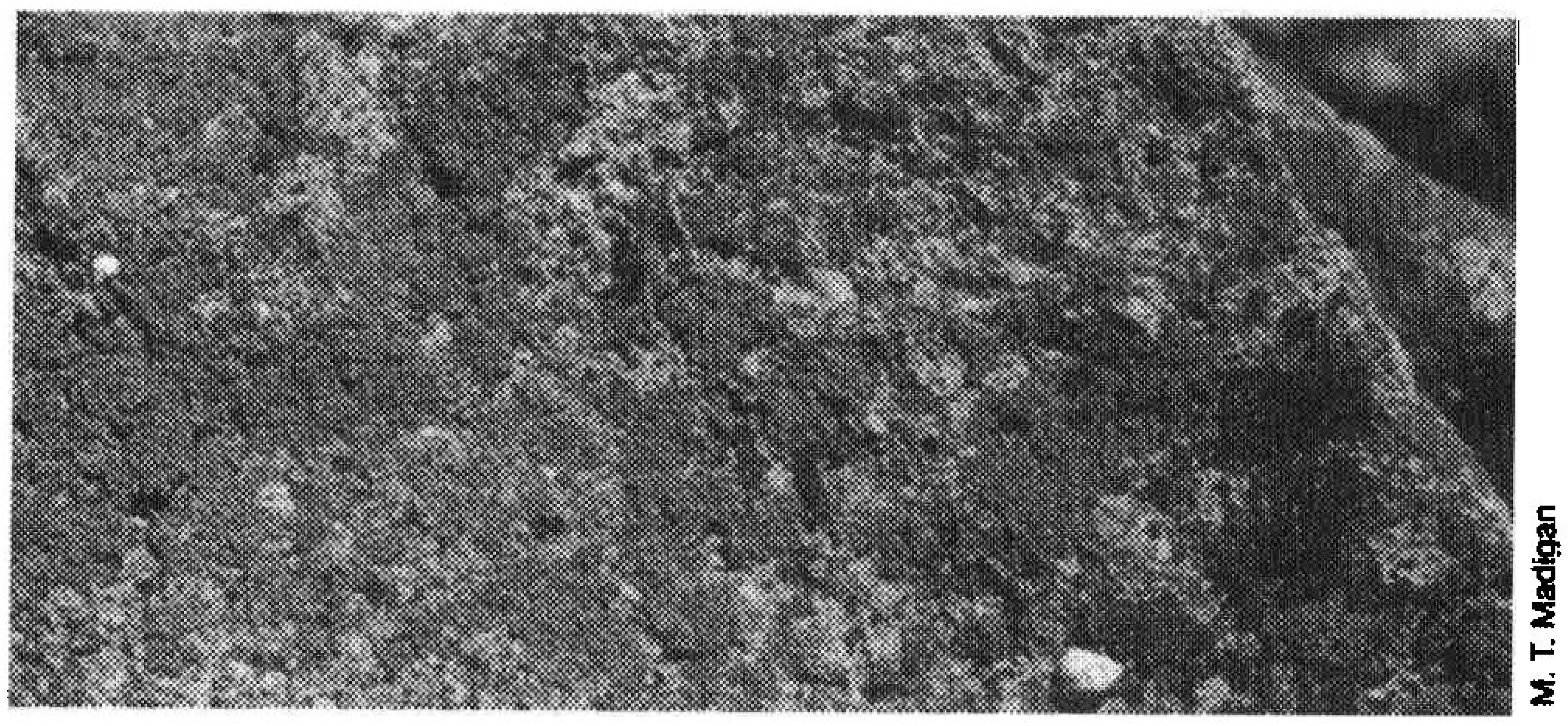
19.20 地衣和菌根

地衣（lichen）是多叶形或成壳状生长，通常生长在光秃的岩石、树干、房檐或荒脊土壤的表面（图 19.51）。地衣是由两种生物——真菌和藻类或蓝细菌组成的一个共生体，但一种真菌可以与几种不同的光养生物建立地衣共生关系，反之亦然。

藻类是光合营养的，能产生有机物，可作为真菌的营养。真菌不能进行光合作用，但可以提供一个牢固的基质，藻类在其中可以生长，以免受风雨侵蚀。另外，真菌促进水的吸收，从地衣生长的岩石或其他基质中，真菌也能吸收藻类生长所需的无机盐。地衣通常发现在其他生物不能生长的表面，它们在这种环境中成功地定居是因为藻类和真菌之间的相互作用关系。



(a)



(b)

图19.51 地衣。(a) 地衣生长在死的树枝上；(b) 地衣包被于大块岩石表面。

地衣结构和生态学

地衣是由光养生物细胞包埋在许多真菌细胞中的一个牢固的联合体组成（图19.52)，地衣的形状主要取决于真菌，许多真菌能够形成地衣联合体；藻类类型多样性

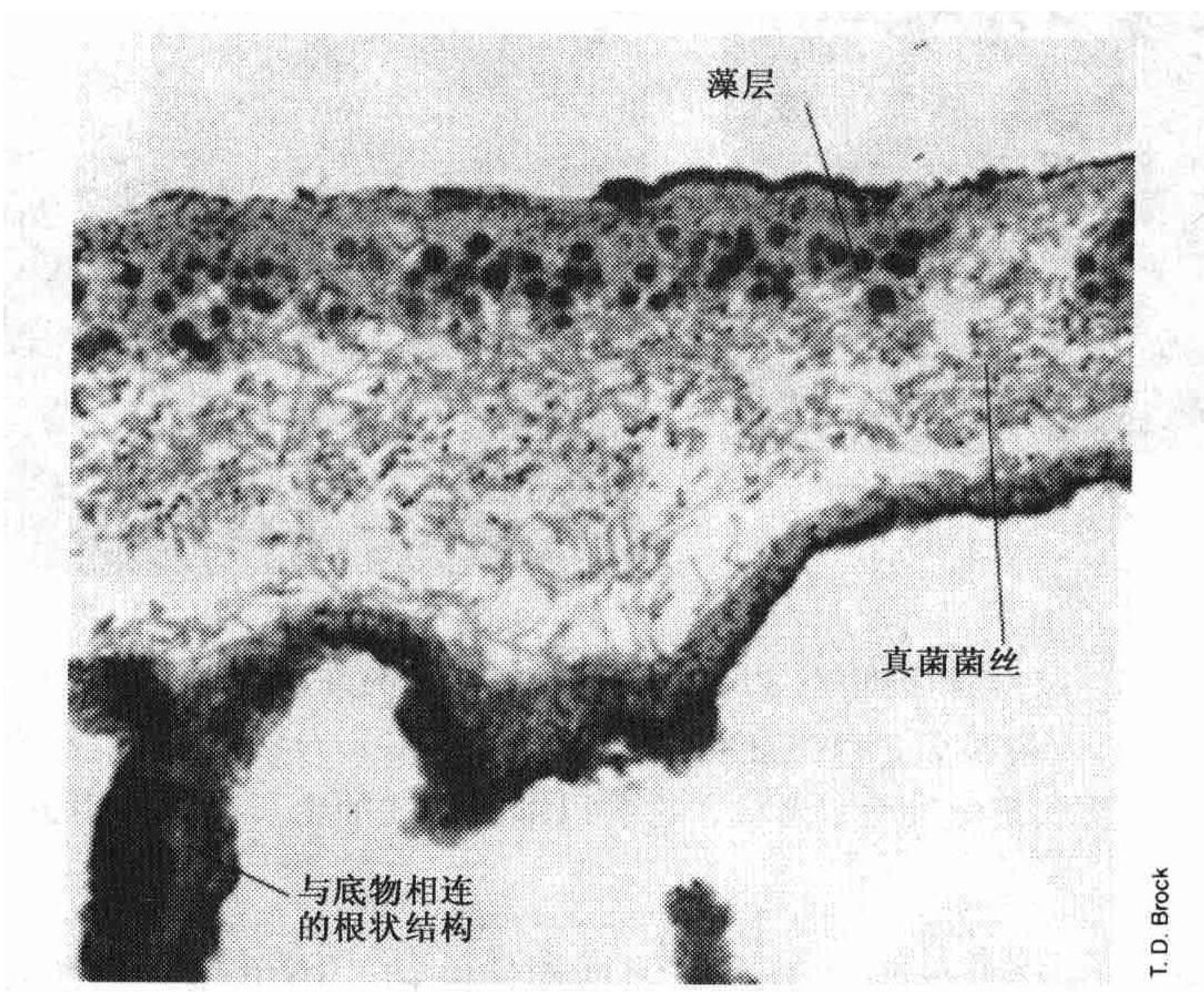


图19.52 地衣结构。地衣横切面的显微照片，为了吸收更多的光，藻层位于地衣结构的适当的位置。

非常小，许多不同种类的地衣可能由同一种藻类组成。有些地衣由蓝细菌，通常是固氮种类，代替了藻类作为光合营养组分。藻类或蓝细菌通常存在于地衣结构确定的层或块中（图 19.52）。

真菌从联合体中明显地得到益处，但藻类是如何获得好处的呢？地衣酸（lichen acid）是真菌分泌的一种复杂的有机复合物，可提高藻类所需的无机营养的溶解和螯合。真菌另一个作用是防止光养生物干枯，地衣生存的大多数生境非常干燥（岩石、裸露土地、房顶）（图 19.52）。总的来讲，真菌要比藻类更能忍受干旱条件。

大多数地衣生长十分缓慢，例如，岩石表面所看到的一个 2cm 地衣可能实际上生长了几年。地衣生长速率不同，从不到 1mm/年到超过 3cm/年，这取决于组成共生的生物种类、降雨量、光照。

菌根

菌根（mycorrhizae）（字面上意谓“根的真菌”）指植物根和真菌间的共生联合体。大多数陆生植物的根都具有菌根，菌根一般有两种类型：外生菌根（ectomycorrhizae）（图 19.53），指真菌细胞形成一个广泛的外鞘包围在根的外部，很少有菌丝穿入根组织内部；内生菌根（endomycorrhizae），指真菌菌丝深深地嵌入根组织内部。

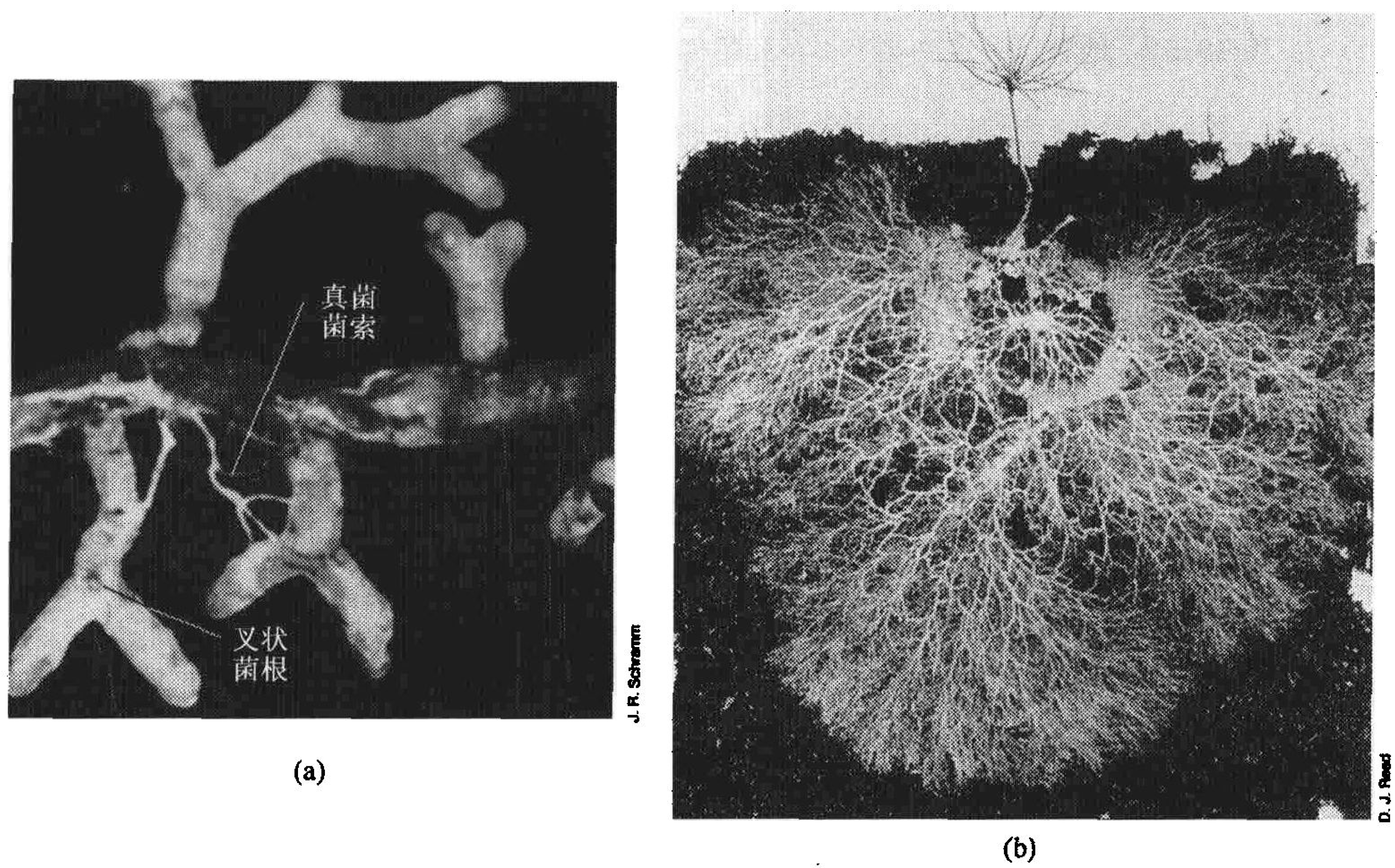


图 19.53 菌根。（a）一种松树硬叶松（*Pinus rigida*）典型的外生菌根的根，具有真菌疣革菌（*Thelophora terrestris*）的菌索；（b）扭叶松（*Pinus contorta*）幼苗，显示真菌乳牛肝菌（*Suillus bovinus*）的吸收菌丝大面积形成，这种以伞状形式的生长通过外生菌根吸收土壤中营养。

外生菌根主要出现在森林树种中，特别是在针叶树、山毛榉、栎等在北方和温带林中最多。森林中，几乎每株树的每个根都是有菌根的。菌根树［如松树（*Pinus*）］的根系是由长根和短根组成，短根的特点是二叉分枝（图 19.53），显示典型真菌定居，长

根通常也被占据。内生菌根甚至比外生菌根更广泛，灌木菌根是一种内生菌根，检测陆生植物种类的80%以上的根是这种。

多数菌根真菌不能分解纤维素和落叶层，但可利用简单的碳水化合物来生长，并且需要一种或多种维生素。菌根真菌除了从土壤中得到无机物外，还从根的分泌物中获得碳源。除了与根相连外很少在自然界发现菌根真菌，因此大多数被认为是专性共生体。菌根真菌产生植物生长所需物质诱发根形态的改变，刺激菌根的形成。虽然真菌和根有密切的相互作用，但是单一的一种松树可与40多种真菌形成菌根。

在贫瘠的土壤中能很好地观察到菌根真菌对植物有益的影响，有菌根的树生长繁茂而无菌根的树则相反。例如，当在大草原土壤中种植树木时，一般缺乏适宜的真菌，那么人工接种真菌的树木要比未接种的树木生长快得多（图19.54），菌根植物能更有效地从其周围环境中吸收营养，因此具有竞争优势。这种营养吸收的提高是因为真菌菌丝提供了更大的表面积。例如，图19.53b显示的松树幼苗，外生菌根的真菌菌丝体组成了植物根系吸收面积的绝大部分。

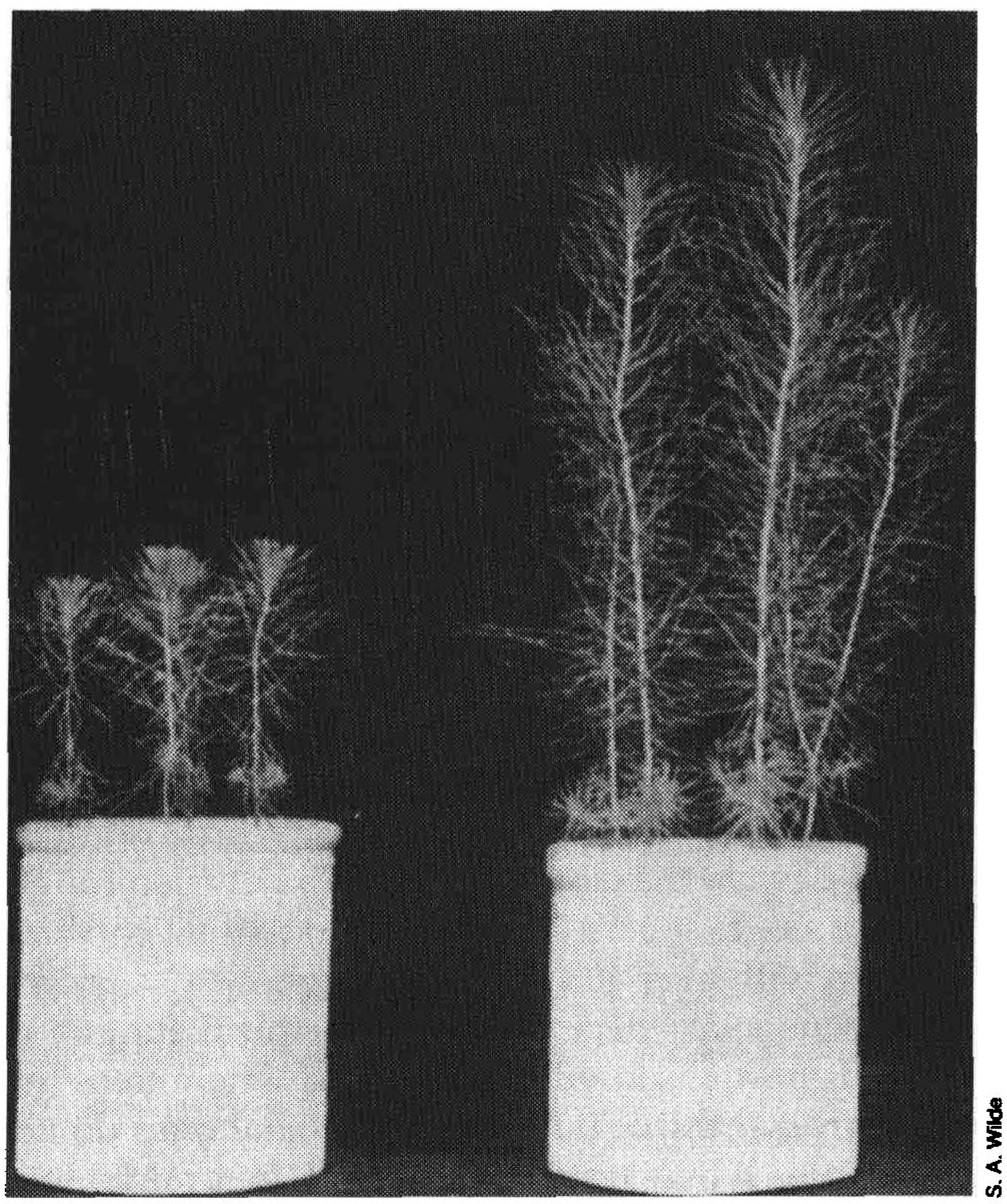


图19.54 菌根真菌对植物生长的影响。在大草原土壤上生长的一种辐射松（*Pinus radiata*）六月龄的实生苗。左：无菌根的；右：有菌根的。

菌根除了简单地帮助植物吸收营养外，在控制植物多样性方面也有重要的作用。田间实验显示①土壤中菌根的数量及多样性与②土壤中植物多样性形成具有正相关性，因此，菌根是植物-微生物共生的典型代表，对合作双方都有利：菌根植物在生理上具有

更好的功能，能在特定的植物群落中竞争得更成功，而真菌可以得到稳定的无机营养。

概念检查

地衣是真菌和藻类（或蓝细菌）的共生联合体。菌根是由真菌和植物的根形成的共生联合体，可以提高它们吸收营养的能力。菌根对植物健康和竞争性具有非常好的作用。

◆ 内生菌根与外生菌根有什么不同?

◆ 为什么与植物形成的菌根联合体被认为是一种共生关系?

19.21 农杆菌属与根癌病

一些微生物是植物的病原菌，也就是说可以导致植物疾病。农杆菌属（*Agrobacterium*）与根瘤细菌根瘤菌属（*Rhizobium*）（见 19.22 节）非常相近，它所包括的生物能使许多种植物引起肿瘤生长，研究最多的两个种是根癌农杆菌（*A. tumefaciens*）[引起根癌病（crown gall disease)] 和发根农杆菌（*A. rhizogenes*）[引起发根病（hairy root disease)]。

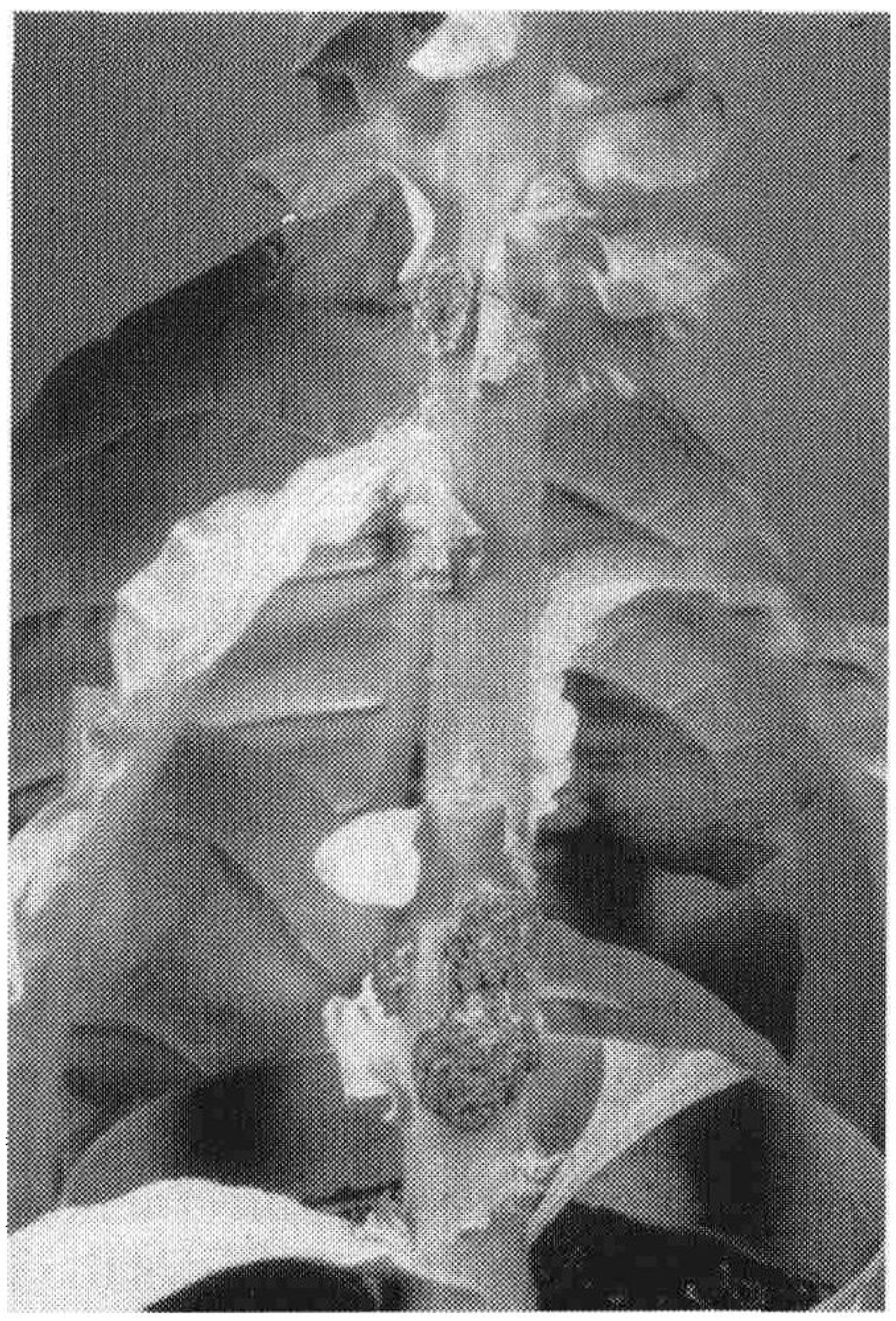


图 19.55 根癌。农杆菌属根癌细菌造成的烟草植物根癌肿瘤的照片。根癌农杆菌（*A. tumefaciens*）引起这种棕色的、类似木质的根癌在植物不同部位生长。根癌是果树和各种观赏植物（如玫瑰和菊花）的独特问题。这种疾病通常不杀死植物，但可以削弱植物，使植物对干旱和其他疾病更敏感。独立的菌瘿作为根癌农杆菌细胞库维持感染。

尽管当植物受伤后，通常形成组织的良性积累，称为愈伤组织（callus)。但由根癌农杆菌诱发的生长（图 19.55）不同于愈伤组织的生长，而是显示了不可控制的生长，因此这类似于动物中的肿瘤生长。一旦被诱发，即使在没有农杆菌细胞的情况下，这些肿瘤也可以继续生长，也就是说，一旦农杆菌造成了诱发肿瘤的条件，那么它的存在也就不再必要了。

如果农杆菌细胞诱发肿瘤形成（图 19.55)，那么必定有一种称为 Ti 质粒（诱发肿瘤）的大质粒（图 19.56）存在其中，发根农杆菌中有一个类似的质粒称为 Ri 质粒是诱导发根病所必需的。接下的感染是 Ti 质粒的一部分称为转移 DNA（T-DNA）结合在植物基因组上，T-DNA 携带的基因使肿瘤形成并产生大量的修饰氨基酸称为冠瘿碱(opine)。章鱼碱（octopine）[N^2-(1,3-二羧乙基)-L-精氨酸]和胭脂碱（nopaline）[N^2-(1,3二羧丙基)-L-精氨酸]是两种普通的冠瘿碱，它们是由 T-DNA 转化的植物细胞产生的，是农杆菌

细胞的碳源和氮源。

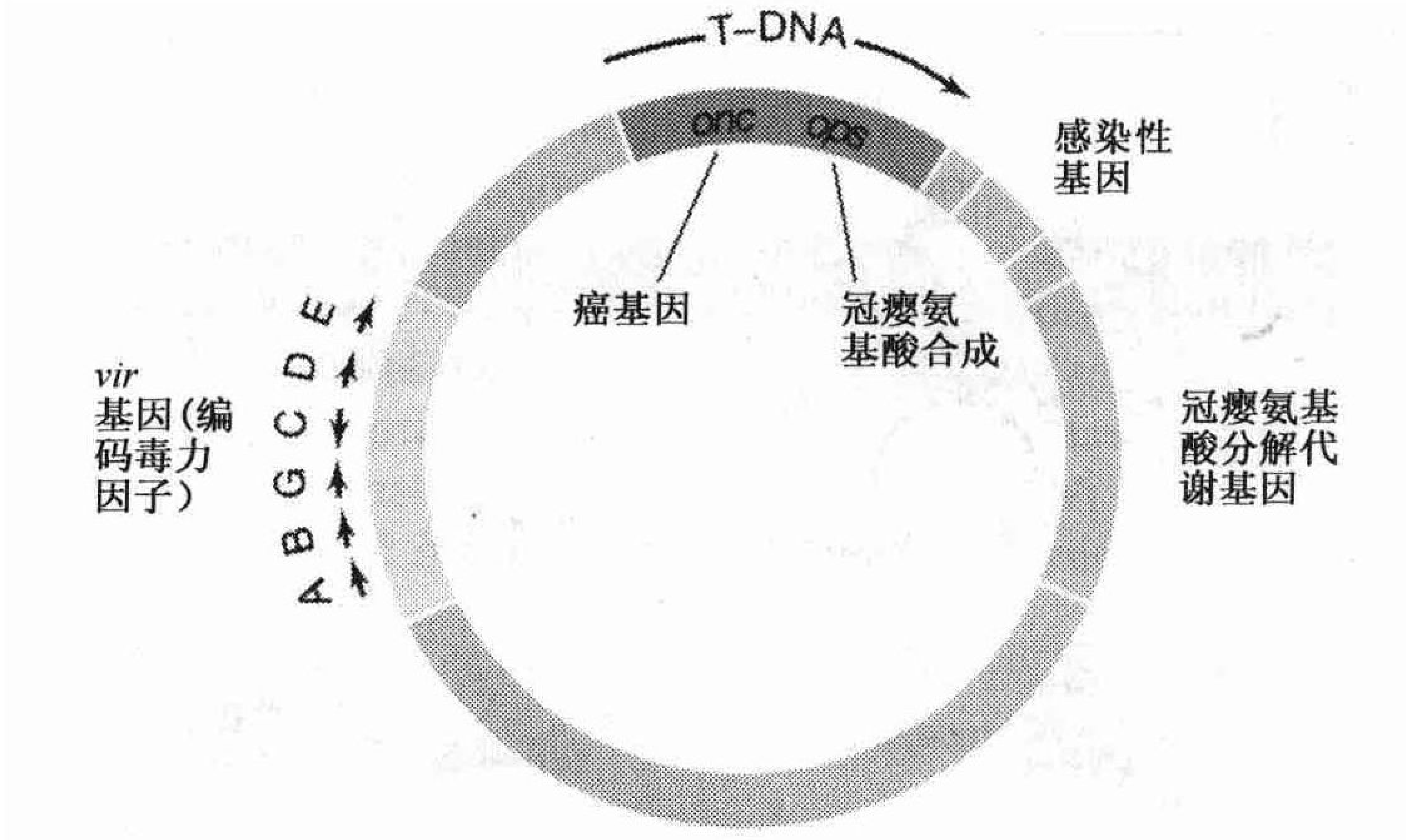


图 19.56　根癌农杆菌 Ti 质粒的结构。 T-DNA 是实际转移到植物中的区域，箭头表示每个基因转录的方向，整个 Ti 质粒约 200kb，T-DNA 约 20kb（31.10 节中进一步讨论 Ti 质粒）。

识别和 T-DNA 转移

为了起始肿瘤状态，农杆菌细胞首先必须附着在植物的一个受伤部位。植物组织通过细菌和植物细胞表面的互补受体分子识别农杆菌，植物受体分子是一类果胶（一种复杂的多糖），细菌受体是一类含有 β-葡聚糖的多糖，包埋在细胞壁脂多糖中。

研究根癌农杆菌非致病癌突变株已表明，细菌附着于植物上所需的大多数功能位于细菌染色体上，接下来是吸附，细菌快速合成的纤维素微纤丝固定细胞到受伤部位，实际上是诱捕细菌细胞，在植物细胞表面形成大的细菌团聚体，这是质粒从细菌转移到植物的一步。

图 19.56 显示了 Ti 质粒的结构。尽管感染需要许多基因，但实际上只有 Ti 质粒上的 T-DNA（图 19.56）一小部分区域转移到植物中，T-DNA 含有诱导肿瘤发生的基因。位于 Ti 质粒的 *vir* 基因编码的蛋白质是 T-DNA 转移所必需的（图 19.56），*vir* 基因的表达受受伤植物组织合成的植物信号分子诱导，诱导物包括酚类化合物乙酰丁香酮、对羟基苯甲酸和香草醛。

vir 基因是 T-DNA 转移的关键，*virA* 基因编码的蛋白质激酶（VirA）与诱导分子相互作用，然后使 *virG* 基因产物磷酸化（图 19.57）。后者被磷酸化作用激活并且激活其他 *vir* 基因，*virD* 基因产物（VirD）具有内切核酸酶活性，在 Ti 质粒邻近 T-DNA 区域切开 DNA（图 19.57），*virE* 基因产物是 DNA 结合蛋白，可结合单链 T-DNA，产生内切酶活性，并且运输这个小的 DNA 片段进入植物细胞，VirB 位于细菌细胞膜上，介导单链 DNA 在细菌和植物之间的转移。

因此，T-DNA 转移（图 19.57）类似于细菌的接合（图 10.11）。T-DNA 插入植物核基因组，在其上任何一点都可发生整合，并且该位点上存在特异的颠倒的或定向的串联重复。Ti 质粒的致瘤（*onc*）基因（图 19.56）编码的酶参与植物激素的产生，同时至少有冠瘿氨基酸生物合成中的一个关键酶，这些基因的表达导致了肿瘤的形成。参与

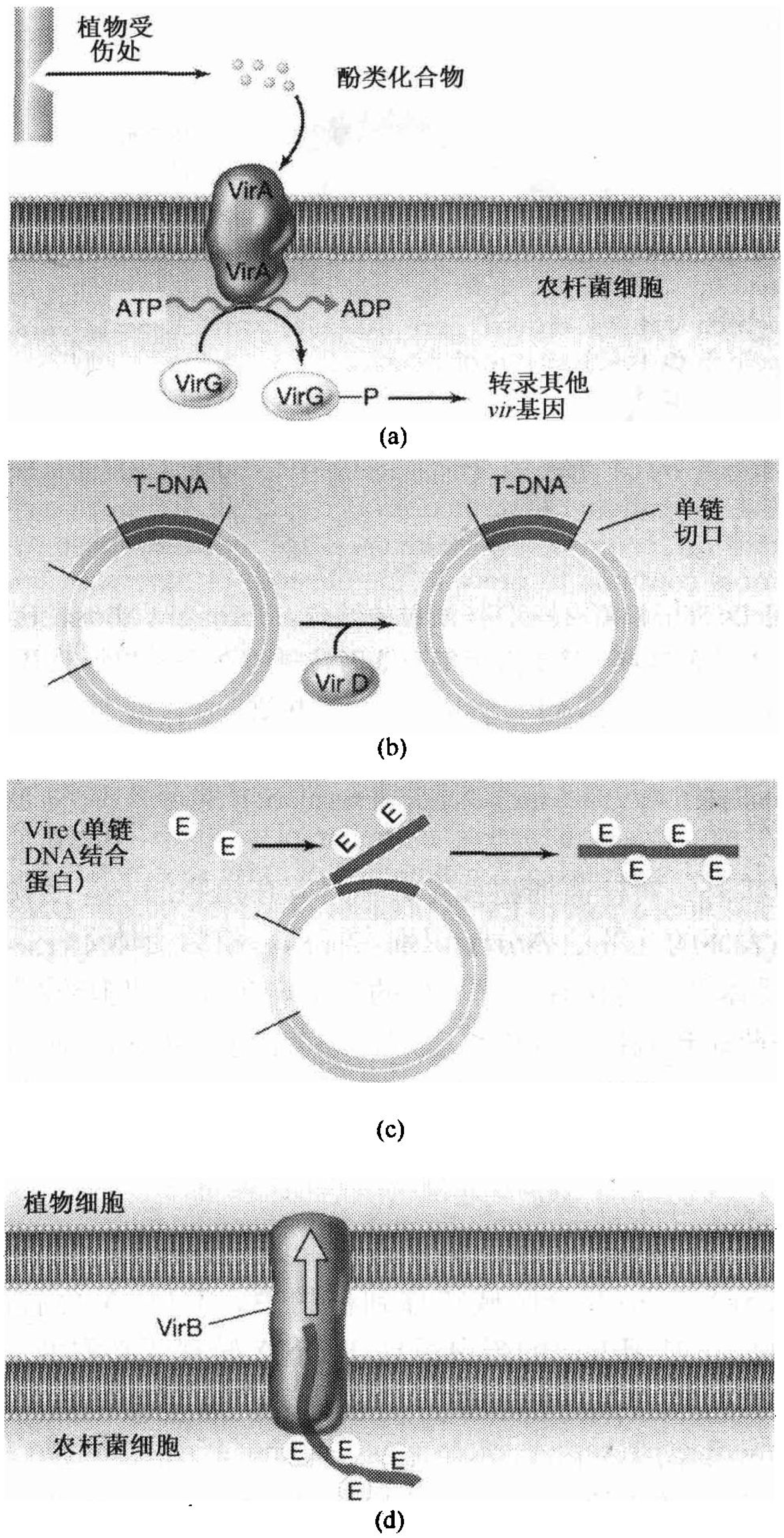


图 19.57 通过根瘤农杆菌转移 T-DNA 到植物细胞的机制。（a）VirA 通过磷酸化作用激活 VirG，VirG 激活其他 *vir* 基因的转录。（b）VirD 是一个内切核酸酶。（c）VirE 是一个单链 DNA 结合蛋白。（d）VirB 的功能是作为农杆菌和植物之间的一个接合桥。在 DNA 整合到植物基因组以前，植物 DNA 聚合酶产生与被转移单链 T-DNA 的互补链。

发根病的 Ri 质粒也含有致癌基因，但是在这种情况下，基因使得植物增加了对生长素的反应性，导致根组织过量产生，出现疾病症状。Ri 质粒也编码几种冠瘿生物合成的酶。

利用 Ti 质粒进行遗传工程

从微生物学和植物病理学角度来讲，根癌和发根病都具有一种独特的相互作用类型，即细菌 DNA 转移到植物细胞中。但一旦这种 DNA 转移机制清楚后，Ti 系统就很快作为载体介导遗传工程 DNA 导入植物中。换句话说，Ti 是一种天然植物转化系统，因此，对 Ti/根癌系统的关注已经从疾病本身转移到在生物工程中新的应用。

通过遗传工程“改造”过的 Ti 质粒宿主缺乏疾病基因，目前，已用于转基因植物的生产。在除草剂和昆虫抗药性方面已有成功的例子，另外，在许多其他的领域正在开发。我们将在 31.10 节中讨论 Ti 质粒作为载体在植物生物工程中的应用。

概念检查

根癌细菌农杆菌与高等植物有着独特的相互关系。细菌的一个质粒（Ti 质粒）能转移其自身的一部分到植物基因组中，通过这种方式造成了根癌的发生。根癌质粒也广泛用于作物植物的遗传工程。

- 什么是冠瘿氨基酸？为什么产生冠瘿氨基酸？
- *vir* 基因与 Ti 质粒中 T-DNA 有什么不同？
- 了解根癌疾病对植物分子生物学有什么好处？

19.22 根瘤细菌与豆科植物共生

最重要的植物细菌相互作用之一是豆科植物与某些革兰氏阴性固氮细菌。豆科植物被定义为在荚果中生种子的植物，是第三大单种有花植物。这个大的种群包括许多农业上重要的植物，如大豆、三叶草、苜蓿、菜豆和豌豆。这些植物是重要商品，是用于豆类加工工业、家养动物喂养及人类营养的主要蔬菜。几种农业工业涉及豆科作物。豆科作物具有不需氮肥就能生长的能力，每年可节约农民购买化肥的百万元。

根瘤菌属（*Rhizobium*）、慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）、中华根瘤菌属（*Sinorhizobium*）、中间根瘤菌属（*Mesorhizobium*）、固氮根瘤菌属（*Azorhizobium*）和光合根瘤菌属（*Photorhizobium*）是革兰氏阴性能运动的杆菌。变形细菌（Proteobacteria）可以自由生活在土壤中或感染豆科植物，并建立一种共生关系。这些属的某些种感染豆科植物的根可导致能固氮（见 17.28 节）的根瘤（root nodule）的形成（图 19.58）；这些共生体的固氮作用在农业上具有重要性，因为它可以导致土壤中化合态氮增加。因为贫瘠的土壤通常缺乏氮素，所以结瘤豆科植物能在其他植物不能生长的地方很好地生长（图 19.59）。

豆血红蛋白和交叉接种群

在正常条件下，无论豆科植物还是它的细菌共生体都可以固氮，两种生物之间是如何相互作用导致氮固定的呢？在纯培养中，当根瘤菌在微需氧条件下生长时，根瘤菌单独可以固氮。表面上根瘤菌需要一些氧气产生能量进行氮固定，但其固氮酶（像其他的

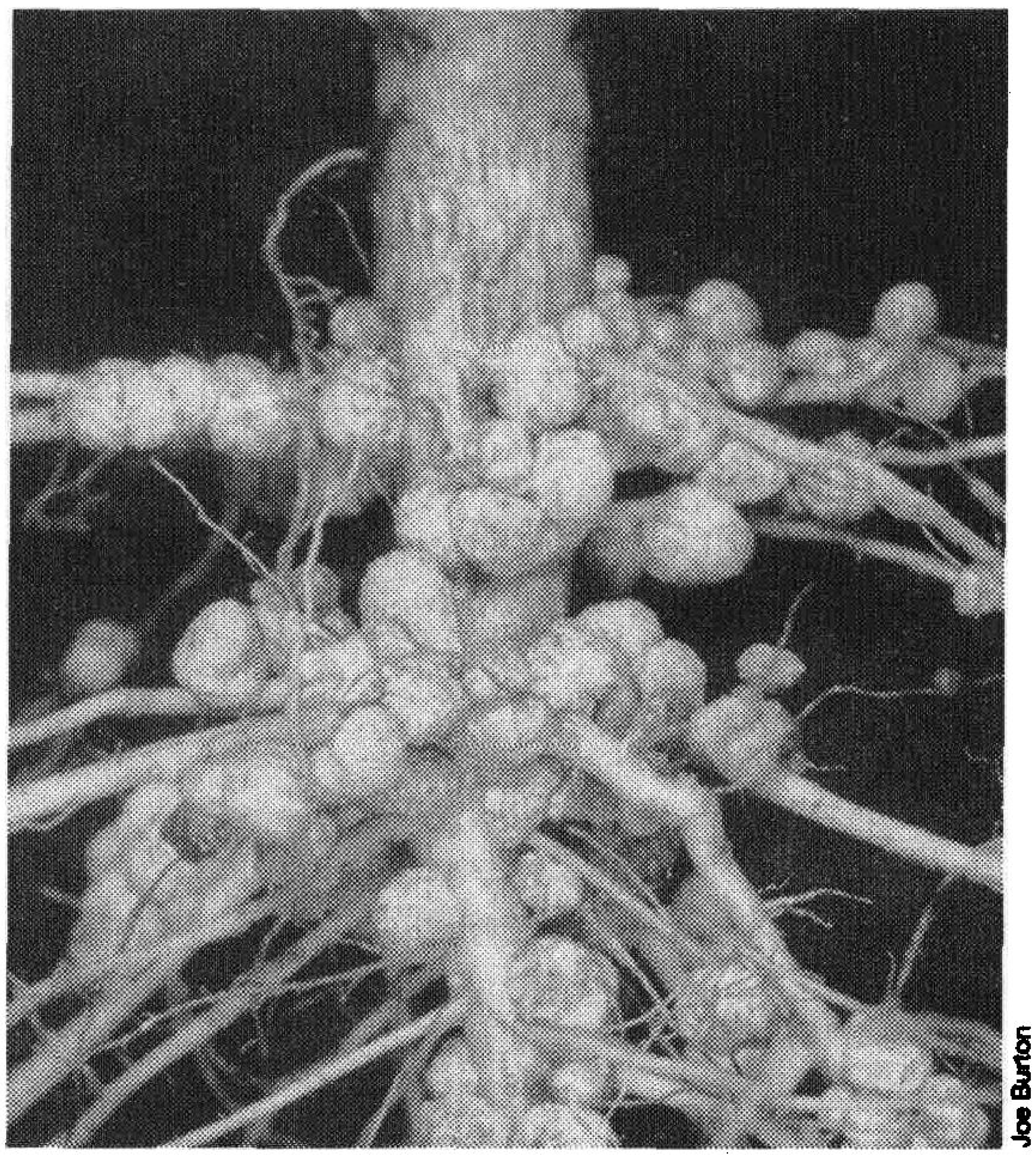


图 19.58 大豆根瘤。由大豆慢生根瘤菌（*Bradyrhizobium japonicum*）感染形成的根瘤。这种大豆植物主要茎的直径约为 0.5cm。



图 19.59 根瘤对植物生长的影响。在缺氮的土壤中生长的无根瘤（左）和有根瘤（右）大豆植物。

固氮生物一样，见 17.28 节）在有氧时是无活性的。

在根瘤中，确切的氧水平是由氧结合蛋白豆血红蛋白（leghemoglobin）来控制的，这种红色含铁的蛋白质存在于成熟固氮根瘤中（图 19.60），是由植物宿主和细菌共生体相互作用诱导形成的。豆血红蛋白的功能是作为氧化（Fe^{3+}）和还原（Fe^{2+}）循环的一个“氧缓冲液”保持根瘤中的自由氧处于一个较低水平。在根瘤中豆血红蛋白结合氧与自由氧的比值一般为 10 000 : 1。

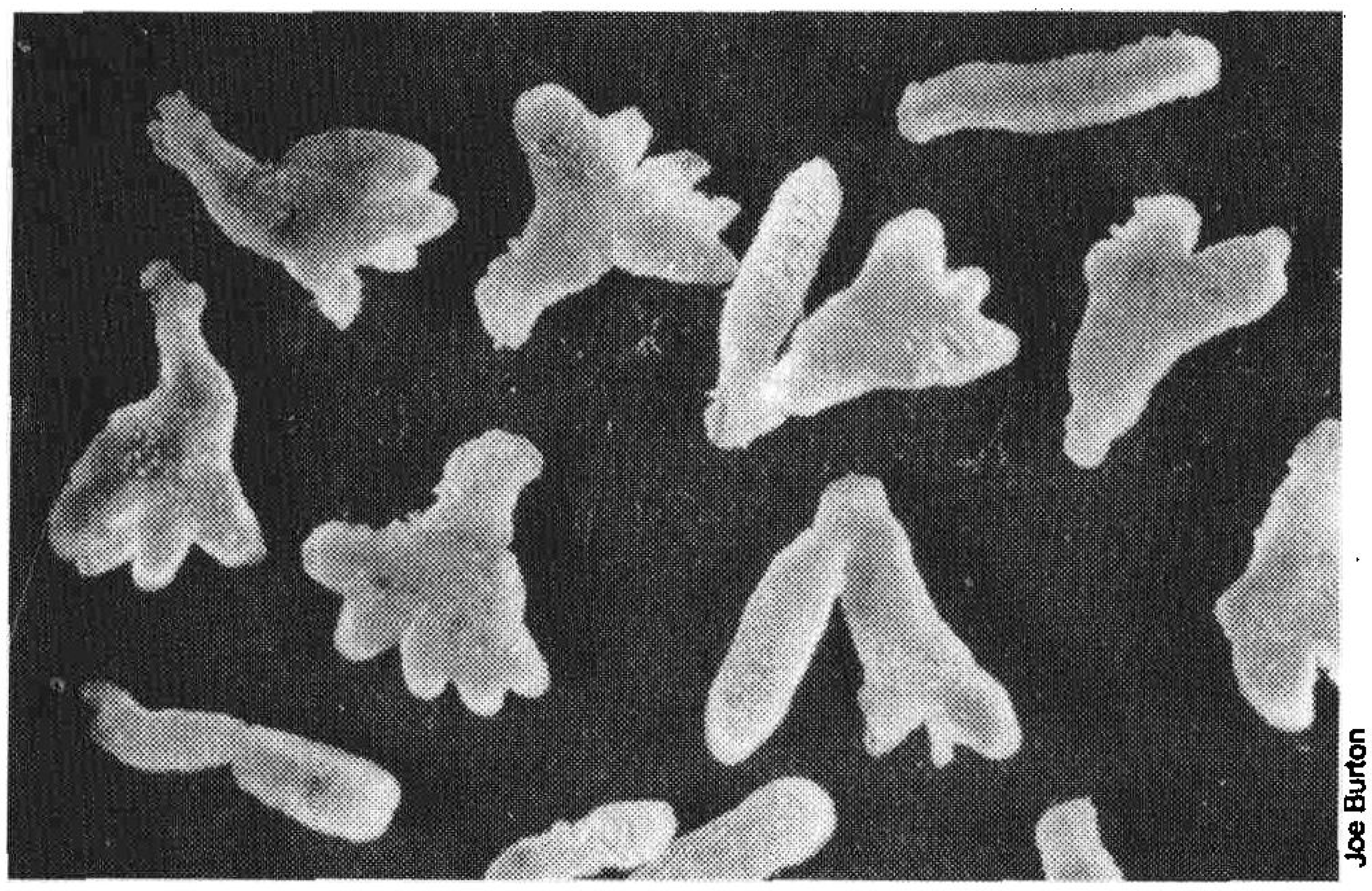


图 19.60　根瘤的结构。豆科植物小冠花（*Coronilla varia*）的根瘤切片，显示红色的豆血红蛋白。

约 90%豆科植物具有形成根瘤的能力，但在不同种的豆科植物和根瘤菌菌种之间存在着明显的特异性，一种根瘤菌一般能够感染豆科植物的某些种，而不能感染其他种。根瘤菌的一种或一种群能够感染一组相关豆科植物，称之为交叉接种群（cross-inoculation group）（表 19.8）。但是，尽管某一根瘤菌株能够感染某一豆科植物，但并不是总能够造成固氮根瘤的产生，如果菌株遗传学上无效，那么形成的根瘤很小，为淡绿色，不能固氮；相反，如果菌株效率很高，则形成的根瘤大，为红色（图 19.60），能固氮。菌株的有效性是由细菌中的基因决定的（见后面章节中 *nod* 基因的讨论），可以通过乙炔还原作用测定（见 17.28 节）。

表 19.8　豆科植物主要的交叉接种群

宿主植物	形成根瘤的菌
豌豆	豌豆根瘤菌蚕豆生物变种[a]（*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*）
菜豆	豌豆根瘤菌菜豆生物变种[a]（*Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*）
菜豆	热带根瘤菌（*Rhizobium tropici*）
莲子	百脉根中间根瘤菌（*Mesorhizobium loti*）
三叶草	豌豆根瘤菌三叶草生物变种[a]（*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*）
苜蓿	苜蓿中华根瘤菌（*Sinorhizobium meliloti*）
大豆	大豆慢生根瘤菌（*Bradyrhizobium japonicum*）
大豆	埃氏慢生根瘤菌（*Bradyrhizobium elkanii*）
大豆	弗氏中华根瘤菌（*Rhizobium fredii*）
长喙田菁（*Sesbania rostrata*）（一种典型的豆科植物）	茎瘤固氮根瘤菌（*Azorhizobium caulinodans*）

a. 豌豆根瘤菌存在几个不同的变种，每种能在不同的豆科植物上形成根瘤。

根瘤形成的不同阶段

感染和根瘤形成的不同阶段，现在已研究得非常清楚（图 19.61），这些阶段是：

1. 植物和细菌的正确识别（recognition）和细菌吸附（attachment）在根毛处；
2. 细菌分泌（excretion）nod 因子；

3. 细菌侵染（bacterial invasion）根毛；

4. 通过感染线进入（travel）主根；

5. 在植物细胞内，形成改变的细菌细胞——类菌体（bacteroid）；同时在固氮时期形成；

6. 植物和细菌继续分裂，形成成熟的根瘤（root nodule）。

现在我们更详细地阐明根瘤的形成。

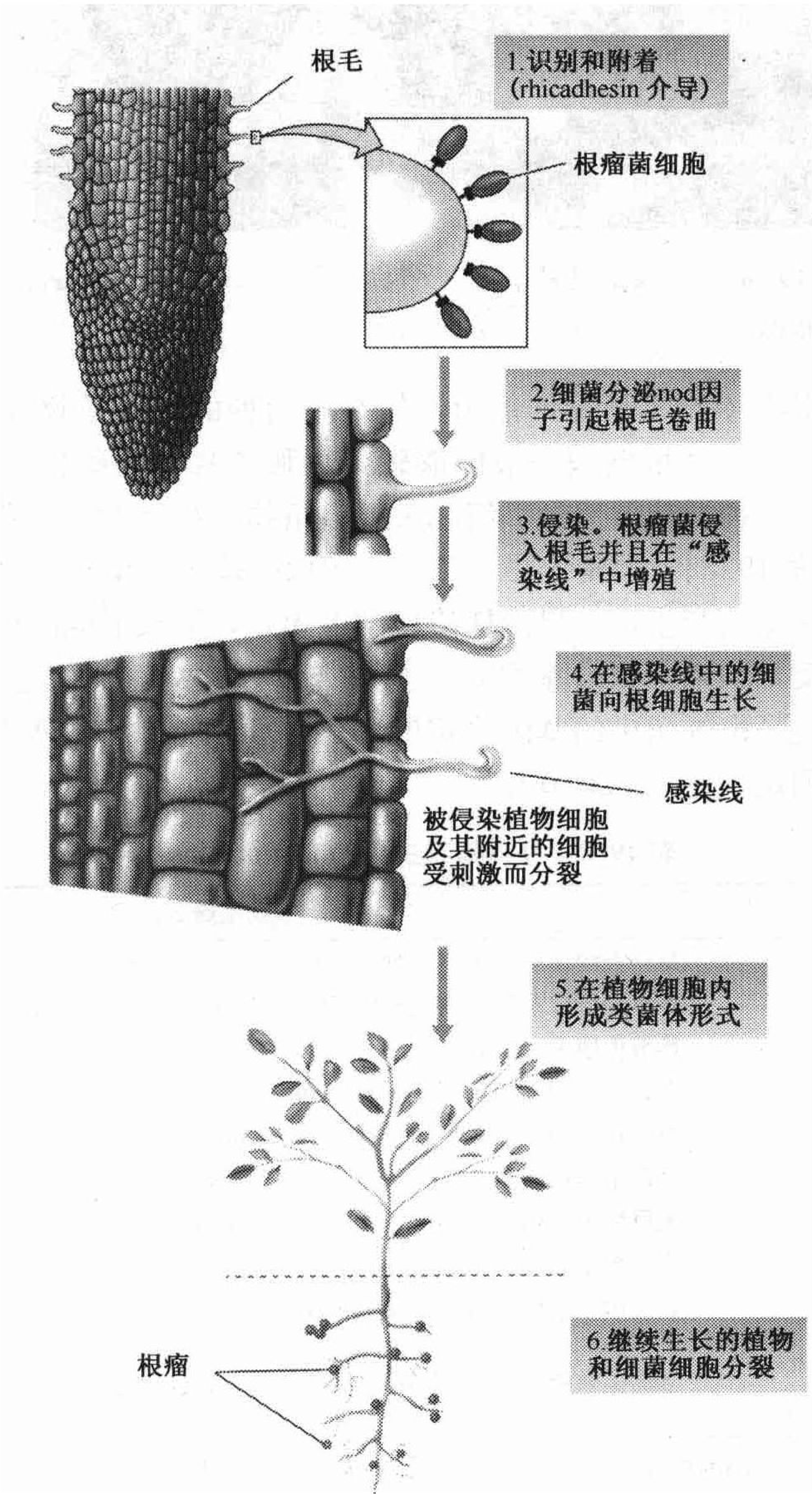


图 19.61 根瘤菌感染豆科植物形成根瘤的步骤。侵染线的显微照片见图 19.62a，根瘤的照片见图 19.58 和图 19.60，类菌体的形成是氮固定的前提。

吸附和感染

豆科植物的根分泌各种有机物质来刺激根际微生物区系的生长，这种刺激作用不只限于根瘤菌，也可刺激各种不同的根际细菌。如果土壤中存在根瘤菌，它们在根际生长，形成了较高密度种群，因此，细菌吸附在植物上形成豆科植物-根瘤菌共生是根瘤形成的第一步（图 19.61）。一种特异的黏着蛋白称为 rhicadhesin，存在于根瘤菌属和慢生根瘤菌属所有种的表面，rhicadhesin 是一种钙结合蛋白，通过结合根毛表面的钙复合物起作用。其他的物质，如称为凝集素（lectin）的含糖蛋白和植物细胞膜的特异受体，在植物-细菌吸附过程中也起一定的作用。

根瘤菌细胞最初穿透根毛中是通过根毛顶端进入的，结合后，由于细菌分泌称为 nod 因子（nod factor，见后）的物质，根毛卷曲，细菌进入根毛，诱导植物形成一个纤维素管，称为感染线（infection thread）（图 19.62a），它可以在根毛下面扩散，与根毛相邻的根细胞接着也被根瘤菌感染；并且 nod 因子刺激植物细胞分裂，连续的植物细胞分裂最终导致根瘤的形成（图 19.62 和图 19.63，也见图 19.58 和图 19.60）。

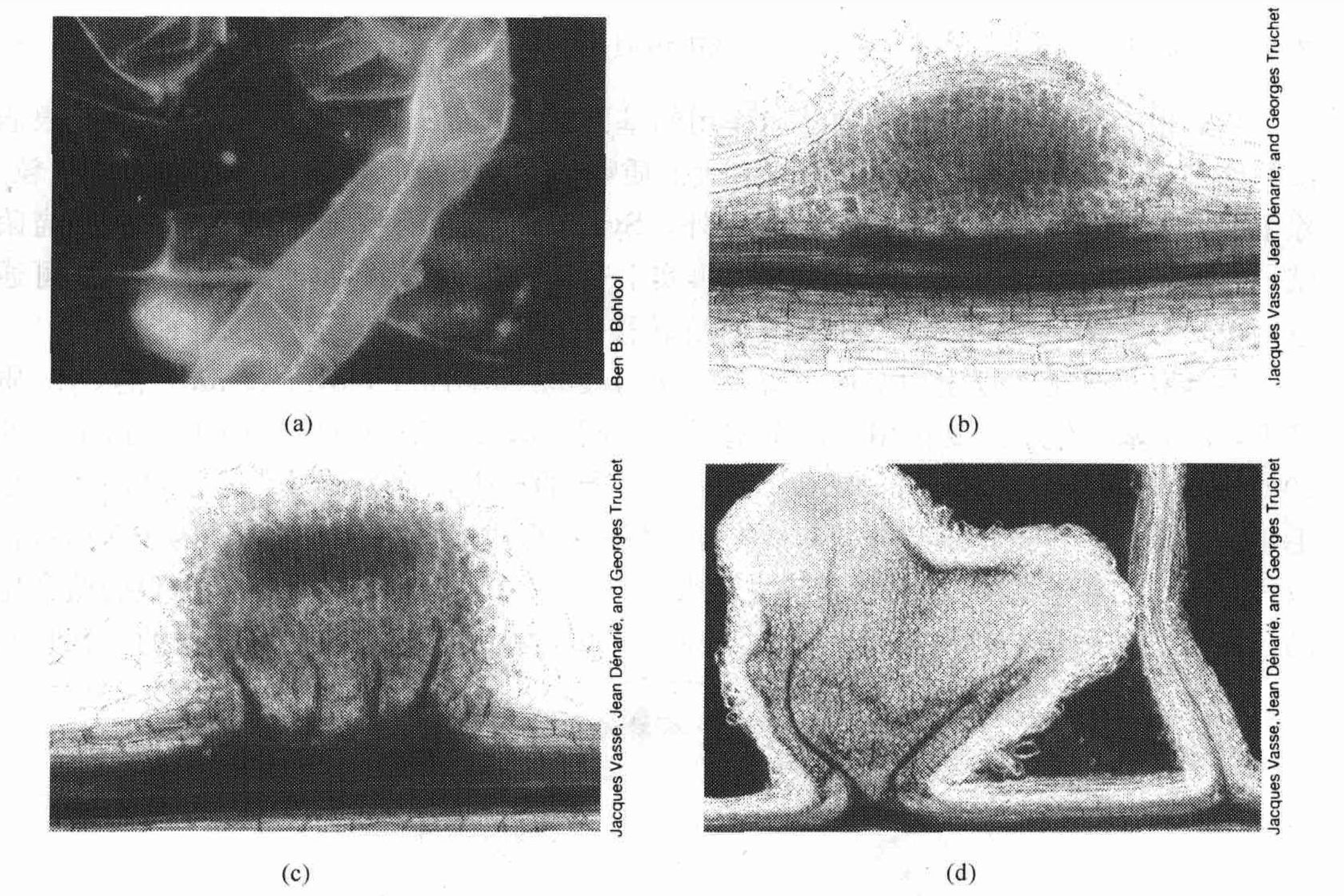


图 19.62 感染线和根瘤的形成。（a）豌豆根瘤菌三叶草生物变种（*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*）形成的感染线来自白车轴草（*Trifolium repens*）的根毛处，感染线是由纤维素管组成，细菌通过它可以进到根细胞中。（b～d）显示由苜蓿中华根瘤菌（*Sinorhizobium meliloti*）细胞感染苜蓿根形成根瘤的不同发展时期。豌豆根瘤菌三叶草生物变种和苜蓿中华根瘤菌细胞约 2μm 长。大豆和苜蓿从感染到有效地形成根瘤约一个月时间。图片 b～d 经许可摘自 *Nature* 351：670～673（1991），Macmillan Magazines Ltd.。

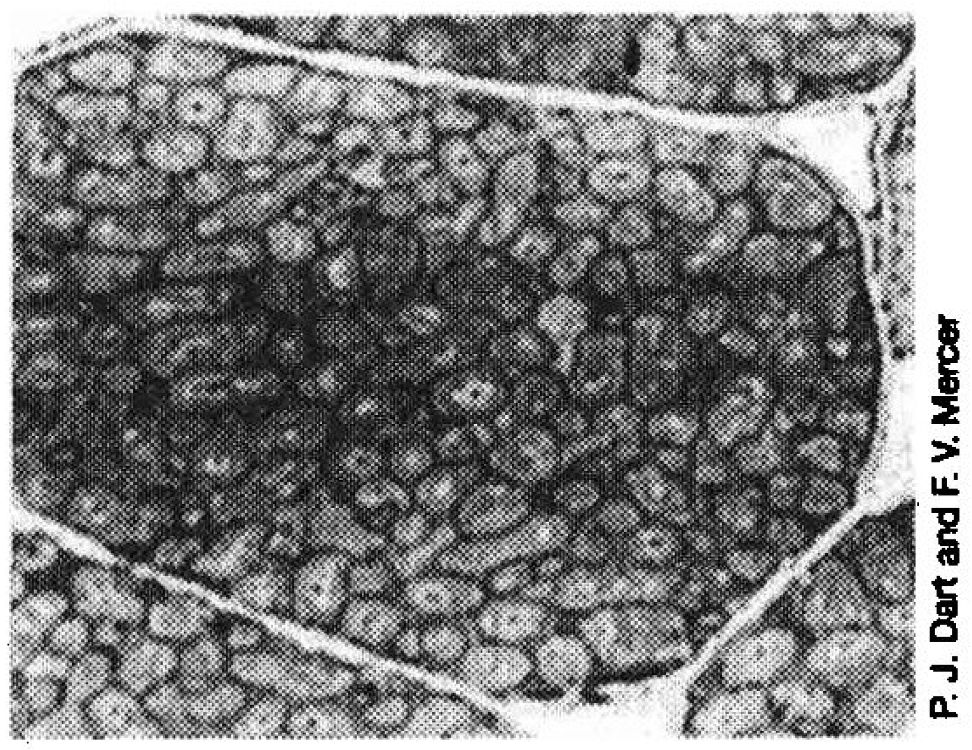


图 19.63 豆科植物根瘤的横切片。 充满单个细菌的地下苜蓿根瘤的薄切片的电镜照片，豌豆根瘤菌三叶草生物变种（*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*）细胞约 2μm 长。

类菌体

根瘤菌在植物细胞内迅速增殖，并且变成膨胀、畸形、多分枝的形体，称为类菌体（bacteroid)。类菌体可被植物细胞膜整个包围或被植物细胞膜包围成几个小部分，形成的结构称为共生体（symbiosome）（图 19.67)。只有在共生体形成之后，固氮作用才开始（固氮根瘤可以通过乙炔还原为乙烯来检测，见 17.28 节和图 17.71)。当植物死于根瘤腐败时，释放细菌到土壤中。类菌体不能分裂，但少数休眠的杆状细胞通常存在于根瘤中，它们利用腐败根瘤的部分产物作为营养来增殖，然后细菌可以引发其他根的感染或在土壤中以自由生活形式存在。

根瘤的形成：*nod* 基因、Nod 蛋白和 nod 因子

特异根瘤菌株引起豆科植物结瘤作用的基因称为 *nod* 基因（图 19.64)。不同根瘤菌的许多 *nod* 基因是保守的，并且含有大的质粒，称为 Sym（共生，symbiosis）质粒。除了 *nod* 基因可以导致特定的结瘤作用外，Sym 质粒也含有特定的基因，限制根瘤菌某一特定种对应某一特定的宿主植物。事实上交叉接种种群的特异性（表 19.8）可通过简单转移它的 Sym 质粒来跨根瘤菌种群转移。

在豌豆根瘤菌蚕豆生物变种（*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*）的 Sym 质粒中，*nod* 基因位于固氮作用的两个基因簇之间，即 *nif* 基因（图 19.64)。这个种的 10 个 *nod* 基因已被鉴定，*nodABC* 基因参与寡糖的产生，称为 nod 因子，可以诱发根毛卷曲，同时引发植物细胞分裂，最终导致根瘤的形成（图 19.62)。nod 因子是由各种取代基同与之相连的 *N*-乙酰葡糖胺主链组成（图 19.65)。宿主特异性是由根瘤菌产生的 nod 因子的确切结构决定的，因此，除了 *nodABC* 基因外，它们是普遍的，并且它

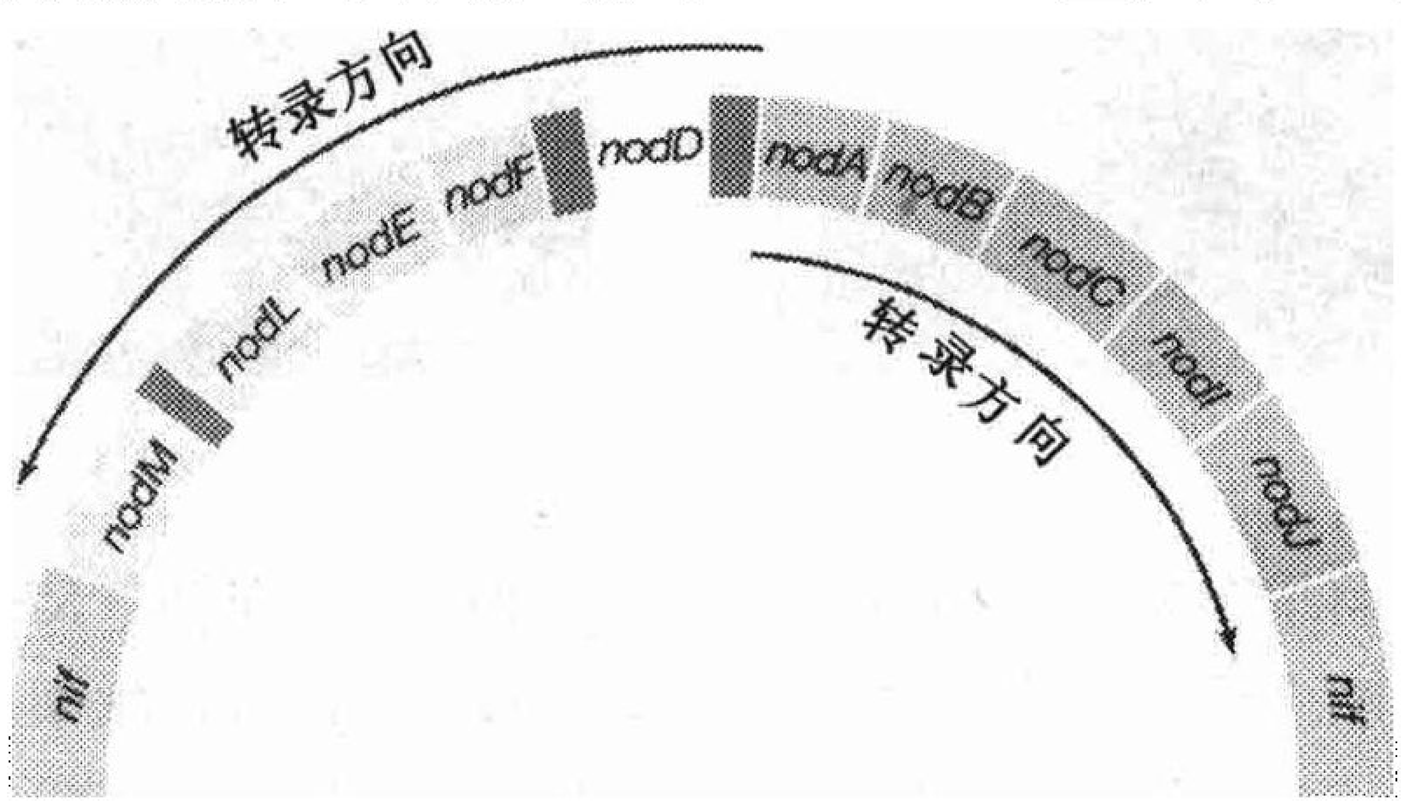
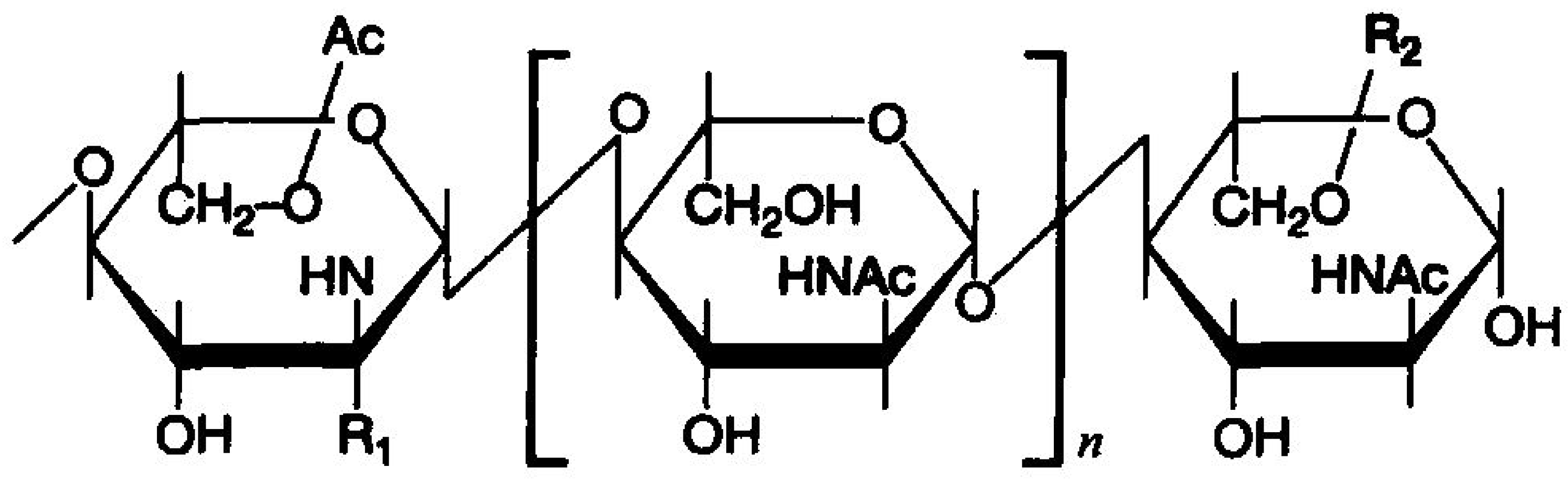


图 19.64 *nod* 基因。 豌豆根瘤菌蚕豆生物变种 Sym 质粒 *nod* 基因簇的组构，这是使豌豆结瘤的种。*nodD* 产物控制其他 *nod* 基因的转录，*nod* 盒子用红色突出，箭头表示 *nod* 基因转录方向，*nif* 基因编码固氮作用的蛋白质（见 17.28 节）。

的产物合成 *nod* 主链，每种根瘤菌含有其他 *nod* 基因编码在基本的 nod 因子主链上引起化学变化的蛋白质形成种特异性 nod 因子（图 19.65）。



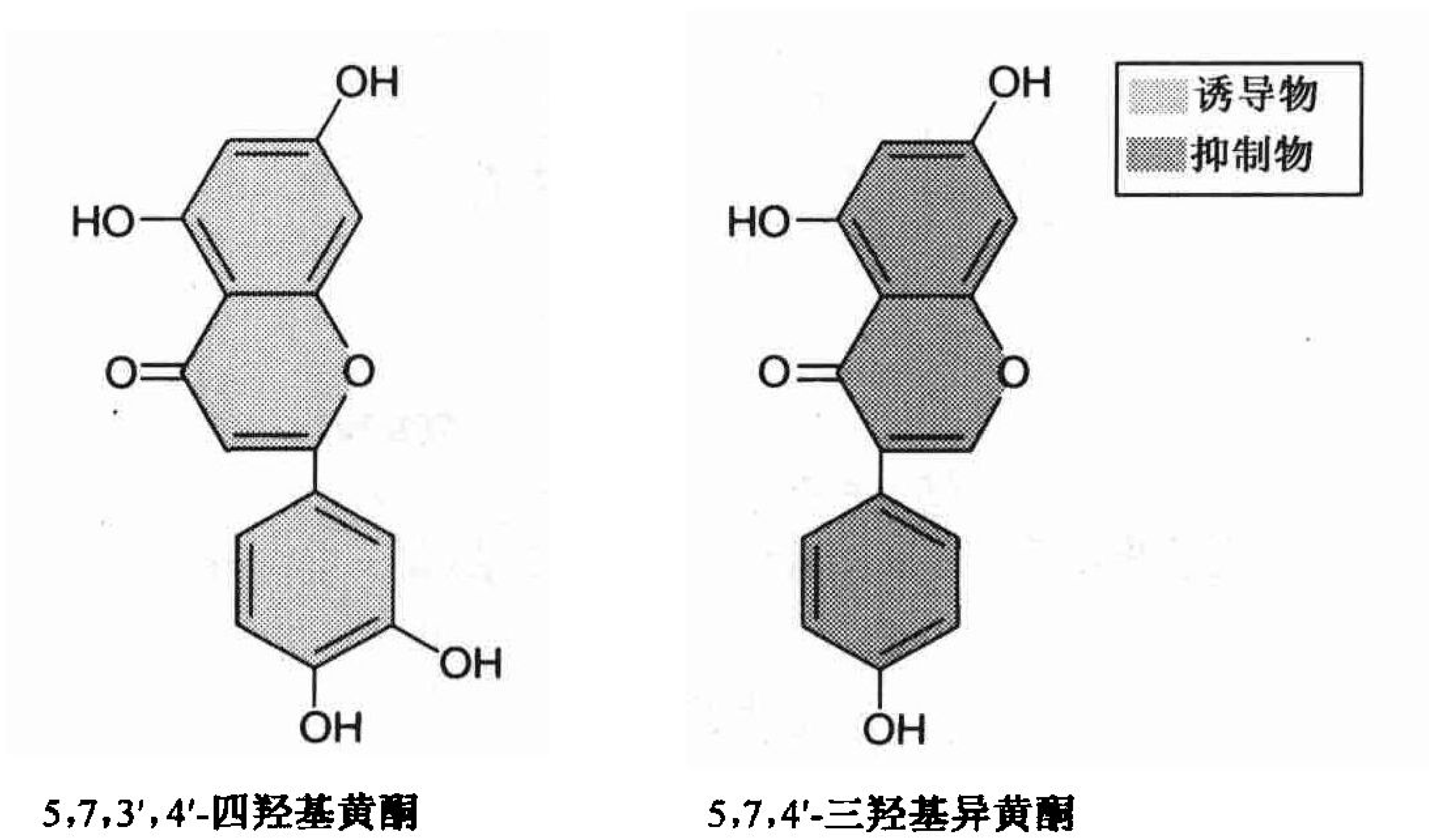
(a)

种	R_1	R_2
苜蓿中华根瘤菌	C16:2 或 C16:3	SO_4^{2-}
豌豆根瘤菌蚕豆生物变种	C18:1 或 C18:4	H 或 Ac

(b)

图 19.65　nod 因子。（a）由苜蓿中华根瘤菌（*Sinorhizobium meliloti*）和豌豆根瘤蚕豆生物变种产生的 nod 因子的一般结构和（b）表中结构不同（R_1，R_2），表示每个种确切的 nod 因子。中央的已糖单位可重复 3 次，C16：2 含 2 个双键的棕榈酸；C16：3，含 3 个双键的棕榈酸；C18：1，含 1 个双键的油酸；C18：4，含 4 个双键的油酸；Ac，乙酰。

豌豆根瘤菌蚕豆生物变种中，*nod D* 基因编码一个调节蛋白质 Nod D，它控制其他 *nod* 基因的转录（图 19.64），Nod F 编码特异的乙酰载体蛋白用于 Nod A 乙酰化 nod 因子（图 19.65b），Nod E 和 Nod L 与宿主范围（交叉接种群）有关，Nod M 是葡糖胺合成酶，参与 nod 因子合成，Nod I 和 Nod J 是膜蛋白质，其功能是从细菌细胞中运走 nod 因子。



5,7,3′,4′-四羟基黄酮　　5,7,4′-三羟基异黄酮

(a)　　(b)

图 19.66　植物黄酮类化合物和结瘤作用。豌豆根瘤菌蚕豆生物变种黄酮类化合物分子的结构，该种使豌豆结瘤。（a）*nod* 基因表达的诱导物。（b）*nod* 基因表达的抑制物。注意这两种分子结构的相似性。（a）显示的结构其通用名称为木樨草素（luteolin），是一种黄酮衍生物。（b）结构称为染料木黄酮（genistein），是一种异黄酮衍生物。

Nod D结合在 *nod* 结构基因操纵子上游DNA，与诱导物分子相互作用后，可提高转录。因此，Nod D是一类正调控蛋白质（见8.6节），主要诱导物是植物黄酮类化合物（flavonoid），该类有机分子是普遍的植物产物（图19.66a）。令人感兴趣的是，一些黄酮类化合物在结构上与豌豆根瘤菌蚕豆生物变种中 *nodD* 诱导物非常相近（图19.66a），其功能是抑制其他根瘤菌 *nod* 基因的诱导（图19.66b），这说明在根瘤菌-豆科植物共生体的植物和细菌之间的部分特异性存在于特定植物分泌的黄酮类化合物的化学性质中。

根瘤中固氮作用的生物化学

正像17.28节所讨论的，固氮作用需要固氮酶（nitrogenase），即含铁和钼两个组分的蛋白质。根瘤中的固氮酶具有类似于自由生活固氮细菌酶的特征，包括O_2敏感性、还原乙炔及N_2的能力（图17.71）。固氮酶位于类菌体内，不释放到植物原生质中。

类菌体完全依靠植物提供能量来进行固氮作用，被运输的有机化合物，通过共生体膜进入类菌体适当的位置，主要是三羧酸循环的中间体，特别是C_4有机酸，如琥珀酸、

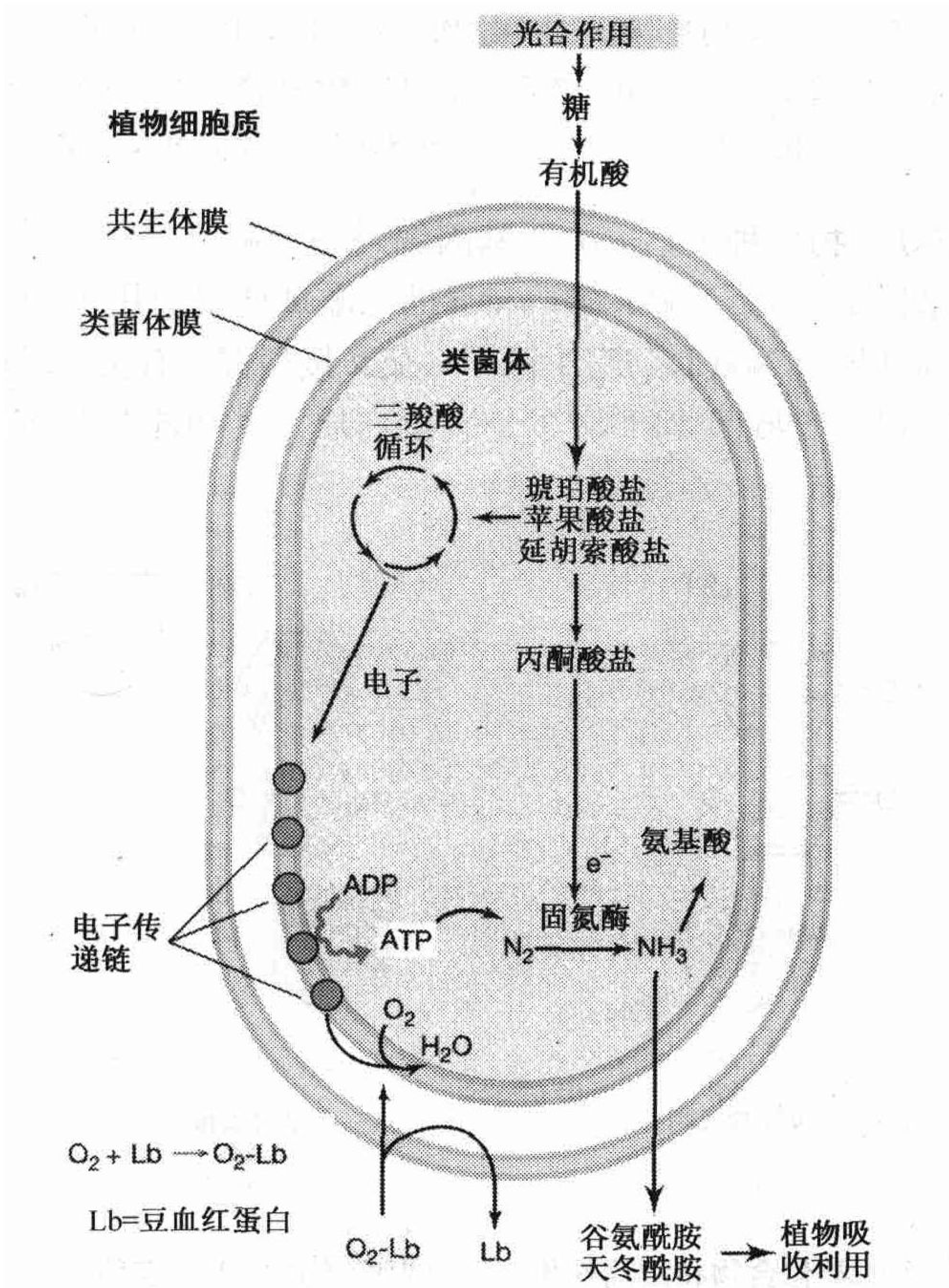


图19.67 根瘤类菌体。类菌体中主要代谢反应和营养交换示意图。共生体是类菌体的集合体，由来源于植物的单层膜包围着。

苹果酸和延胡索酸（图 19.67）。它们可作为 ATP 产生的电子供体，以及转化为丙酮酸后作为 N_2还原的最终电子来源（图 17.71）。

N_2固定的第一个稳定的产物是氨（ammonia），根瘤中将氨同化为有机氮化合物主要是由植物来完成的。尽管类菌体可同化一些氨成为有机氮的形式，但类菌体中氨同化酶水平很低，相反，在植物细胞质存在着较高水平的氨同化酶谷氨酰胺合成酶（图 5.27b），因此，从类菌体运输到植物细胞中的氨可由植物同化为氨基酸，即谷氨酰胺和天冬酰胺（图 19.67）。

茎瘤根瘤菌

尽管大多数豆科植物在它们的根部形成固氮的根瘤，但也有一些豆科植物的种在它们茎部（stem）生出小结。茎瘤豆科植物在热带地区十分普遍，由于渗漏和剧烈的生物活动造成土壤氮源缺乏。这里主要的实验系统是热带水生豆科植物田菁属（*Sesbania*），它可由细菌茎瘤固氮根瘤菌（*Azorhizobium caulinodans*）引起结节（图 19.68）。

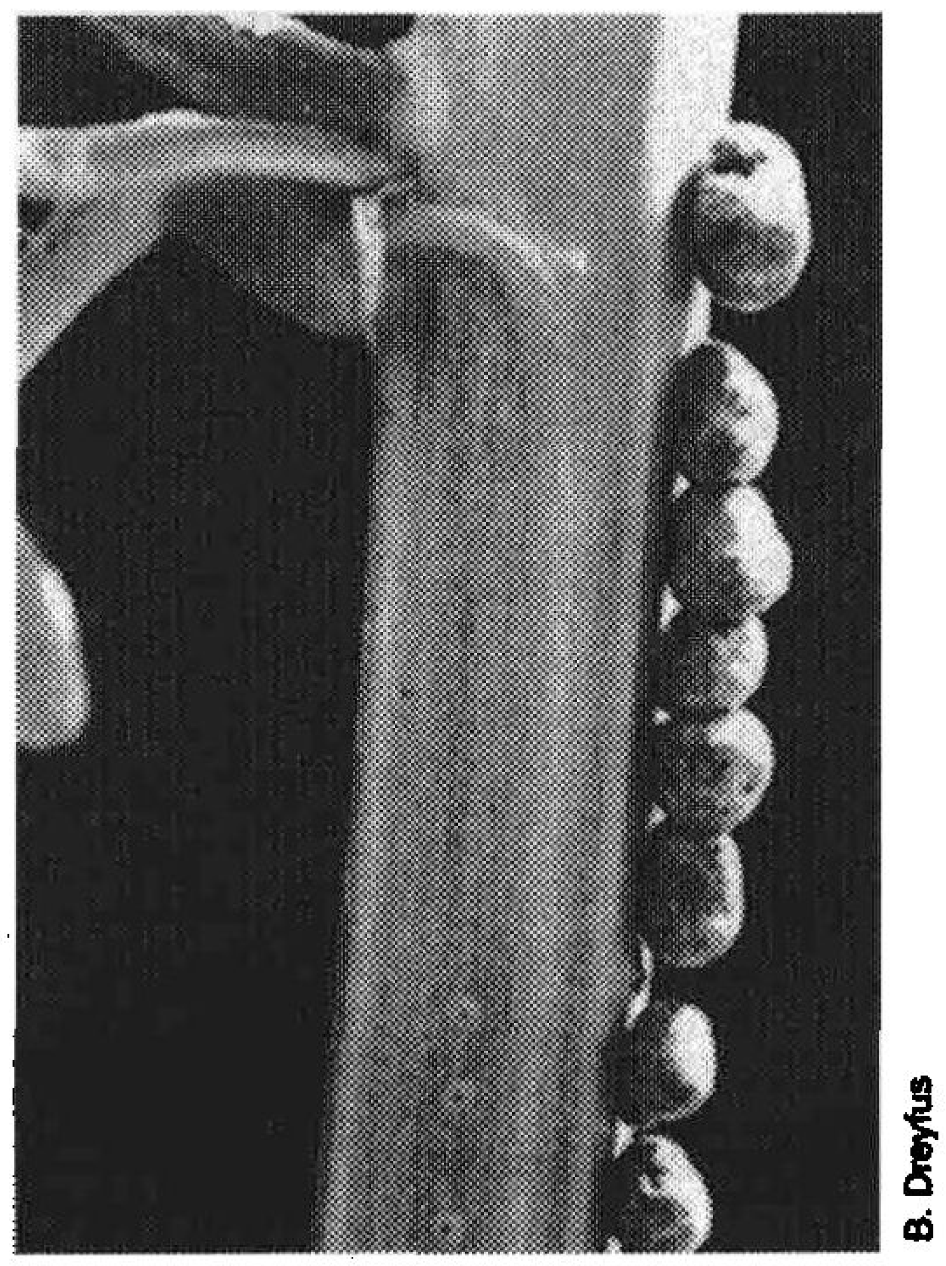


图 19.68　由茎瘤固氮根瘤菌属引起的茎瘤。照片显示的是热带豆科植物 *Sesbania rostrata* 的茎，茎的左边是未接种的部位，右边相对的部位接种了茎瘤根瘤菌。

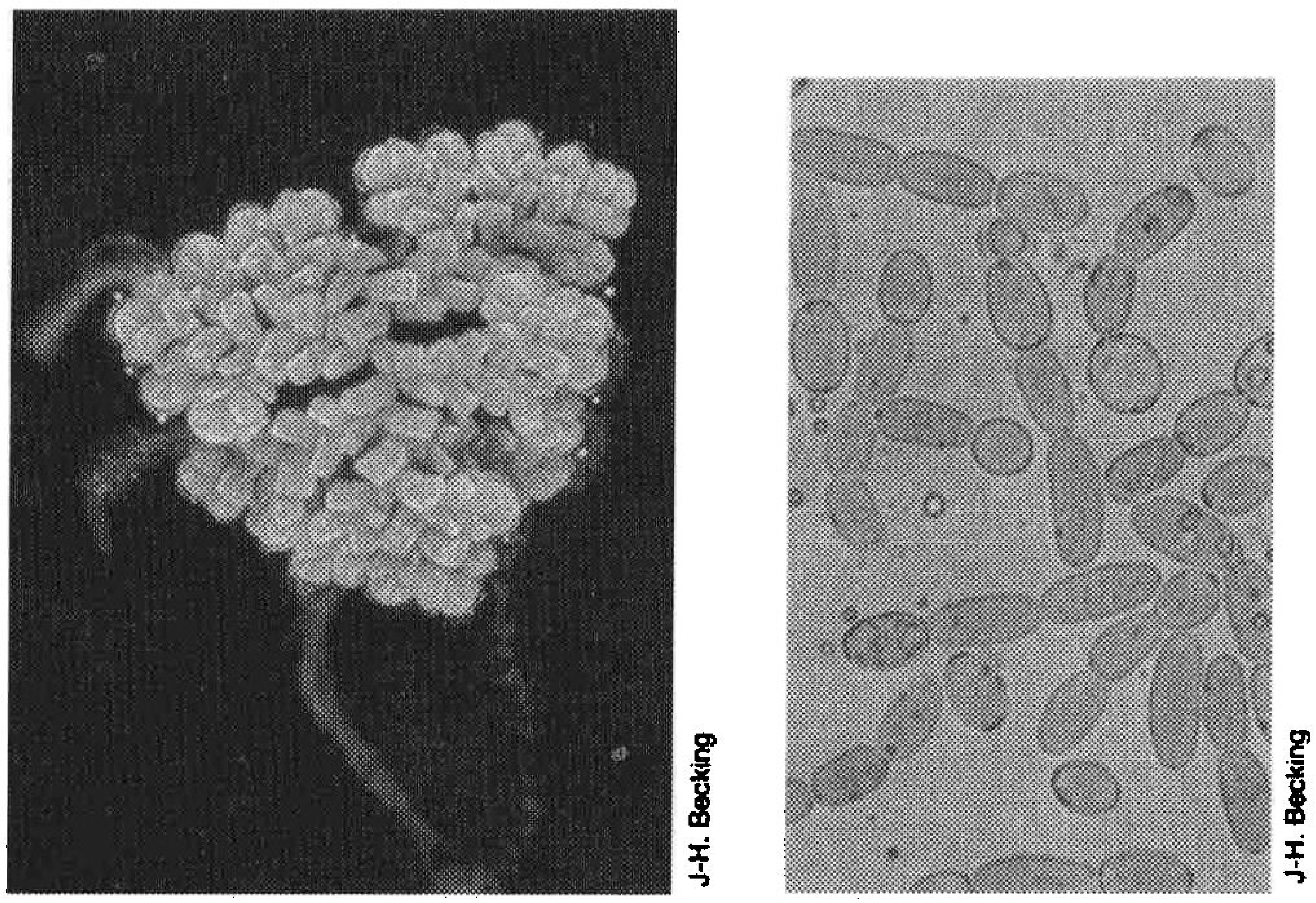
茎瘤主要形成于茎的深层部位或仅在水平面上（图 19.68）。田菁属茎瘤形成的一般顺序与根瘤的形成非常相似，即感染线形成后类菌体形成，然后进入固氮时期。

有趣的是，一些茎瘤根瘤菌产生菌绿素 a，因此具有行使不生氧光合作用的潜能（见 17.4 节）。含菌绿素的根瘤菌属光合根瘤菌属（*Photorhizobium*），在自然界中分布广泛，特别是在热带的豆科植物中；在这些种中，至少光可以提供固氮过程所需的部分能量。

非豆科植物固氮共生：满江红-鱼腥蓝细菌属和弗兰克氏菌属

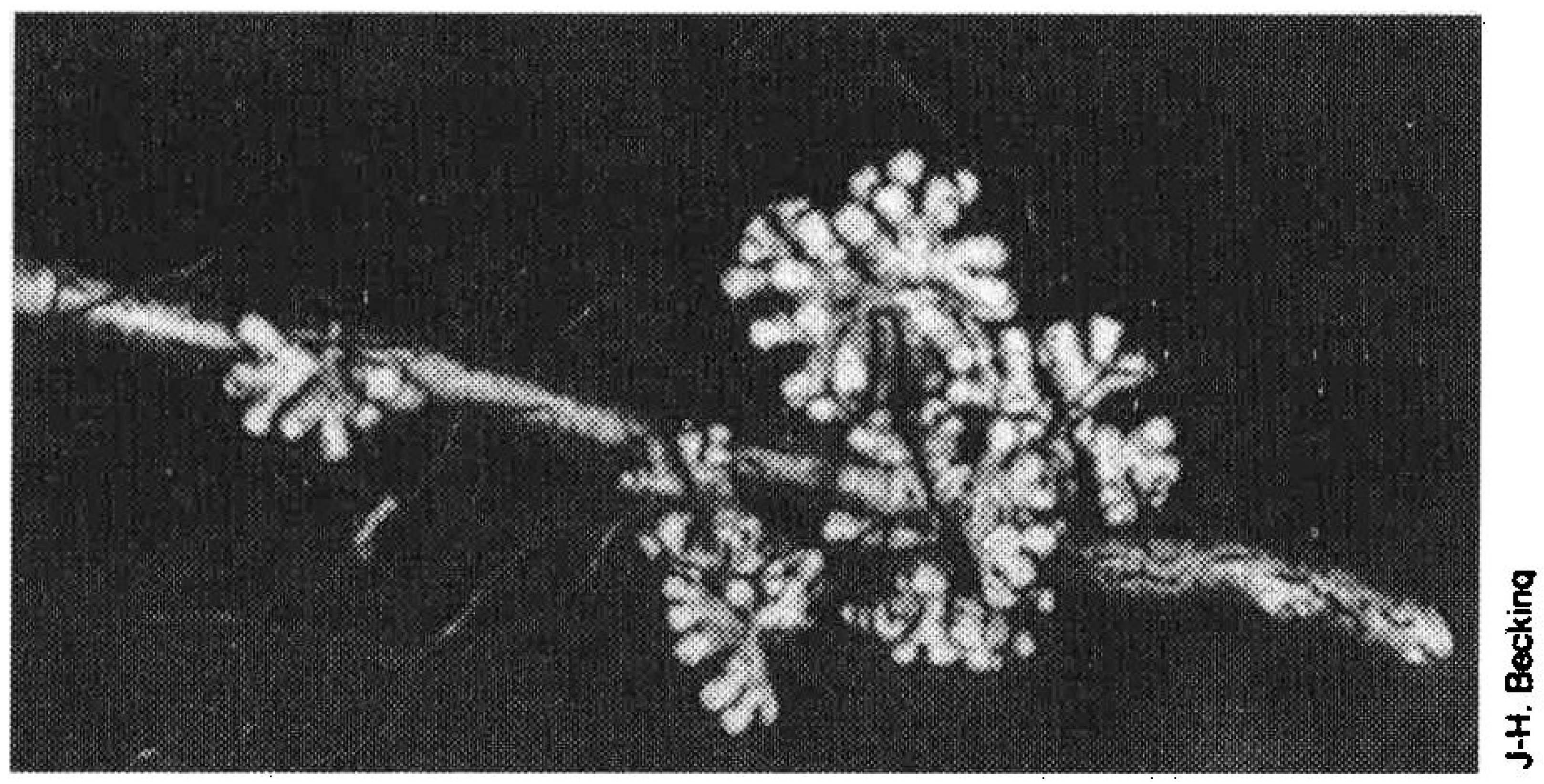
参与固氮共生关系的微生物不只是根瘤菌，其他微生物固氮作用也发生在各种不同的非豆科植物中。例如，固氮蓝细菌同多种植物形成共生，水生蕨类植物满江红（*Azolla*）在其叶的小孔中含有各种异形的称为鲢鱼腥蓝细菌（*Anabaena azollae*）的固氮蓝细菌（图 19.69）。几个世纪来，一直利用满江红固氮，使水稻田肥沃，在种水稻以前，农民们撒盖上满江红使水稻田表面变稠密。当水稻生长后，它们最终将挤出满江红，因为它导致蕨类植物的死亡并释放出氮，被水稻所同化。每一个生长季节重复这个过程，那么农民在不需施氮肥的情况下可获得高产的水稻。

桤树（桤木属，*Alnus*）具有固氮的根瘤（图 19.70），它聚集一种丝状的、类似于链霉菌的固氮生物称为弗兰克氏菌（*Frankia*），尽管在细胞抽提物中检测时，弗兰克氏菌的固氮酶对分子氧敏感，但在全氧压力下，完整的弗兰克氏属细胞可固定 N_2，就像固氮菌属的完整细胞一样（见 12.9 节）。这是因为弗兰克氏菌可以把酶定位在细胞上称作泡囊（vesicle）的终端膨胀物里（图 19.70b），从而对固氮酶进行保护；泡囊具有

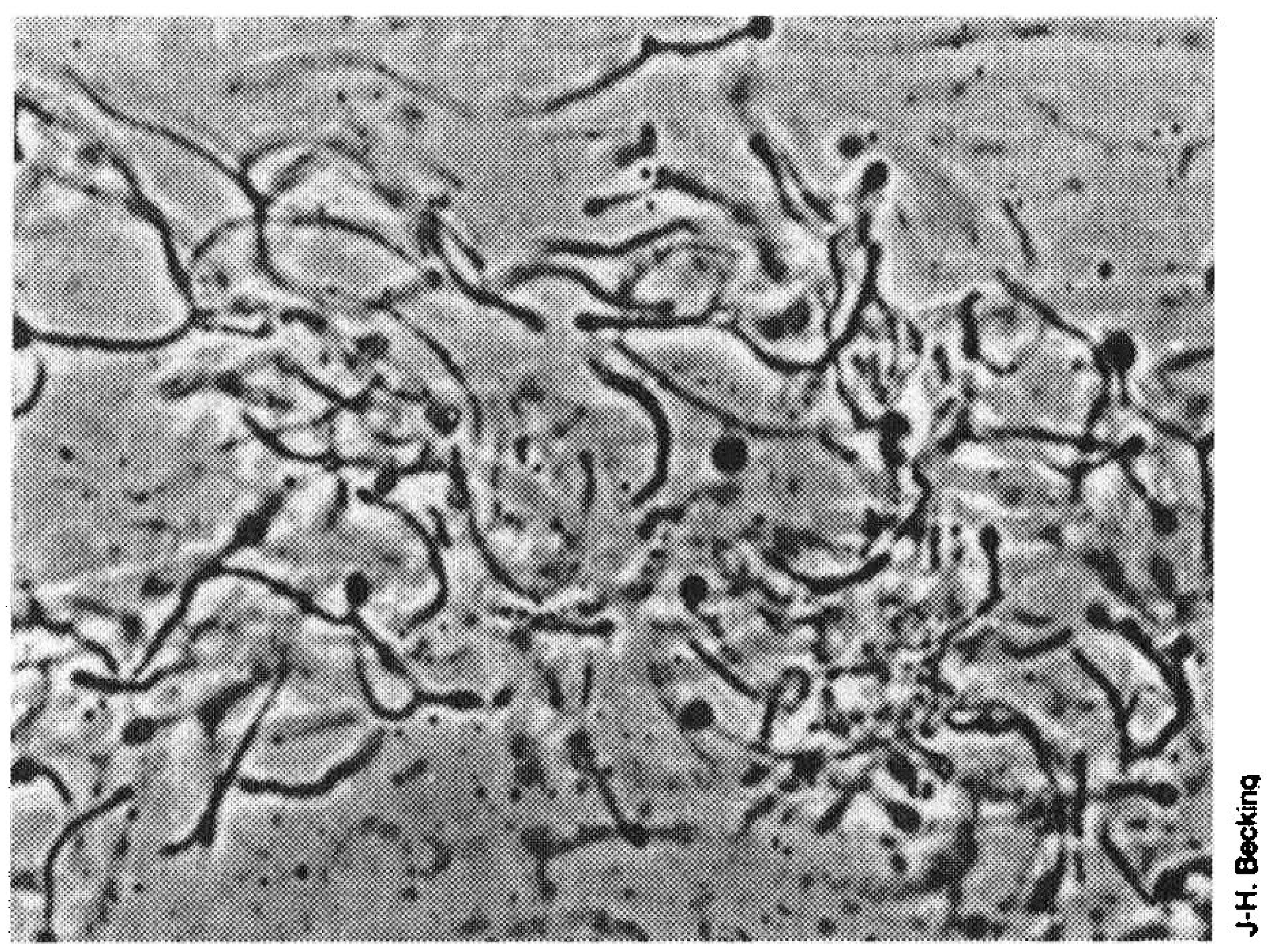


(a) (b)

图 19.69 满江红—鱼腥蓝细菌的共生。（a）显示单个的羽叶满江红（*Azolla pinnata*）植物完整的联合体，植物的直径约为 1cm。（b）压碎的羽叶满江红叶子中所观察的蓝细菌共生体鲢鱼腥蓝细菌（*Anabaena azollae*），鲢鱼腥蓝细菌单个细胞宽约 5μm。注意卵形异形胞（更亮的颜色）是蓝细菌固氮作用的部位。异形胞的讨论见 12.25 节和图 12.80。



(a)



(b)

图 19.70 弗兰克氏菌根瘤和弗兰克氏菌细胞。（a）欧洲桤木（*Alnus glutinosa*）根瘤。（b）从香蕨木（*Comptonia peregrina*），根瘤中纯培养的弗兰克氏菌。注意菌丝丝状体顶端的泡囊（球形结构）。

厚壁，能阻止 O_2 扩散，因此在泡囊内保持与固氮酶活性相配的 O_2 压力，在这一点上，弗兰克氏菌的泡囊类似于一些丝状蓝细菌产生的异形胞（heterocyst），可作为 N_2 固定的部位（见图 19.69b；12.25 节和图 12.80）。

桤树是一种典型的先锋树木，可以在营养贫瘠的土壤上定居生长，可能因为它具有与弗兰克氏菌形成共生固氮关系的缘故。一些其他小的木本植物也可由弗兰克氏菌形成根瘤。与根瘤菌-豆科植物关系不同，单独的弗兰克氏菌可以与几种不同种的植物形成根瘤，从这一点上说明，弗兰克氏菌/根瘤共生现象缺乏特异性。

概念检查

最广泛而且重要的植物-微生物共生现象之一是豆科植物与某些固氮细菌的共生。细菌诱导根瘤的形成，在根瘤中发生固氮作用。植物提供根瘤细菌所需的能源，细菌固氮使植物生长。根瘤细菌在农业上起着重要的作用，因为许多重要的粮食作物是豆科植物。其他固氮共生体包括水生蕨类植物满江红和形成根瘤的弗兰克氏菌。

◆ *nod* 因子对豆科植物有什么影响？

◆ 什么是豆血红蛋白？它的功能是什么？

◆ 什么是类菌体，其内部发生了什么变化？

◆ 根瘤菌和弗兰克氏菌的主要相同点和不同点是什么？

复习题

1. 请列出微生物在其生境中大量生长所需的主要资源和条件。（见 19.1 节和 19.2 节）
2. 解释为什么专性厌氧细菌和专性需氧细菌可以从同一土壤样本中分离出来？（见 19.2 节）
3. 在流动小溪的岩石表面通常含有生物膜，在生物膜中生长的细菌与在流动小溪中生长的细菌相比有什么优势？（见 19.3 节）
4. 生物膜是如何使治疗传染性疾病变得复杂的？（见 19.3 节）
5. 在什么土层微生物数量和活力最高？为什么？（见 19.4 节）
6. 有机物如污水的输入是如何并以什么方式影响河流或小溪 O_2 的含量的？（见 19.5 节）
7. 假设变形细菌视紫质有菌紫红质类似的功能，请描述这种分子是如何有利于细胞生活在有机物非常缺乏的环境如广阔的海洋中的。（见 19.6 节）
8. 耐压细菌与嗜压细菌的不同点是什么？这两个类群与极端嗜压菌有什么不同？耐压菌、嗜压菌和极端嗜压菌的共同特征是什么？（见 19.7 节）
9. 来自热水流火山口存在的什么证据支持了原核生物正生长在非常高的温度的学说？（见 19.8 节）
10. 为什么可以说氧和碳循环是相互联系的？（见 19.9 节）
11. 当互营杆菌属和共养单胞菌属的代谢在热力学上不利于反应时，它们是如何生长的？在实验室培养中，这些生物又是如何生长的？（见 19.10 节）

12. 什么是瘤胃？在反刍动物消化道中，消化过程是如何控制的？瘤胃系统的主要优势和不足是什么？如何比较盲肠动物与反刍动物？（见 19.11 节）
13. 比较和对比硝化作用和反硝化作用的过程，如在所涉及的生物方面，利于每个过程的环境条件方面及伴随每种过程的营养可利用性的变化方面。（见 19.12 节）
14. 为什么硫酸盐还原作用是海洋环境中厌氧呼吸的主要方式，而产甲烷作用是淡水中的主要方式？在海洋环境中发生产甲烷作用吗？如果发生，是如何发生的？（见 19.13 节）
15. 什么生物在无氧状态下参与硫化合物循环？如果硫化能无机营养菌从没有进化，是否在硫化合物的微生物循环中存在一个问题？自然界中，哪种有机硫化合物是令人感兴趣的？（见 19.13 节）
16. 为什么多数铁氧化化能无机营养菌是专性需氧菌？为什么多数铁氧化菌是嗜酸的？（见 19.14 节）
17. 解释自发的化学反应是如何酸化一个煤层的？此后化学反应和氧化亚铁嗜酸硫杆菌是如何继续产生酸的？（见 19.14 节）
18. 氧化亚铁嗜酸硫杆菌是如何在铜矿开采中发挥作用的？由氧化亚铁嗜酸硫杆菌对铜矿直接氧化作用的关键步骤是什么？从浸矿产生的铜溶液中如何回收铜？（见 19.15 节）
19. 汞是如何由 *mer* 系统来解毒的？（见 19.16 节）
20. 什么物理条件和化学条件是水生环境微生物快速降解石油所必需的？设计一个实验，使你能测定出石油氧化过程中的最佳条件。（见 19.17 节）
21. 什么是异生素化合物？为什么微生物很难分解它们？（见 19.18 节）
22. 还原脱氯菌为什么对解决环境污染问题有益？（见 19.18 节）
23. 菌根是如何提高树木生长的。（见 19.20 节）
24. 什么遗传信息存在于 Ti 质粒上？哪种基因可以从 Ti 质粒上缺失而不影响致瘤。（见 19.21 节）
25. 比较和对比根癌农杆菌产生的植物肿瘤和根瘤菌产生的根瘤。什么过程是这两种结构相似的？什么是不同的？质粒对这两种结构形成的重要性是什么？（见 19.21 和 19.22 节）
26. 描述豆科植物根瘤形成的步骤。植物和细菌识别的本质是什么？*nod* 因子是如何帮助控制的？与农杆菌属-植物系统的识别相比是怎样的？（见 19.22 节）

应用题

1. 比较和对比一个湖泊生态系统与热水流火山口生态系统。能量是如何进入每一个生态系统的？在每一个生态系统中，什么是初级生产的基础？每个生态系统中存在着什么生物营养类型，它们是如何满足自身需要的？
2. 设想一个污水厂正在释放含有高浓度铵和磷但有机碳很少的污水，这种污水可能引发什么生物类型的生长？接近和在拐点以上的氧分布与图 19.10a 显示的有何不同？
3. 请看图 19.13 中的数据，记住广阔海洋的水是高度富氧的，推测广阔海洋的古生菌

和细菌可能的代谢生活方式。为什么变形细菌视紫质只存在于一种生物类群而不存在于其他类群？

4. 将^{14}C标记的纤维素放到一个含有少量污泥的小瓶中，并在缺氧条件下封好，几个小时后$^{14}CH_4$就可以出现在小瓶中，讨论发生了什么而产生了这种结果。
5. 设想你发现了一种新的动物，它只以草为食，你怀疑它是一种反刍动物，并且得到一个标本进行解剖观察。如果这个动物是一种反刍动物，描述你希望要找到的消化道的位置和基本组成及你寻找的主要微生物和各种物质。
6. 酸性矿排出水是部分化学过程以及部分生物过程。讨论导致酸性矿排出水的化学和微生物学，并指出主要的生物反应。

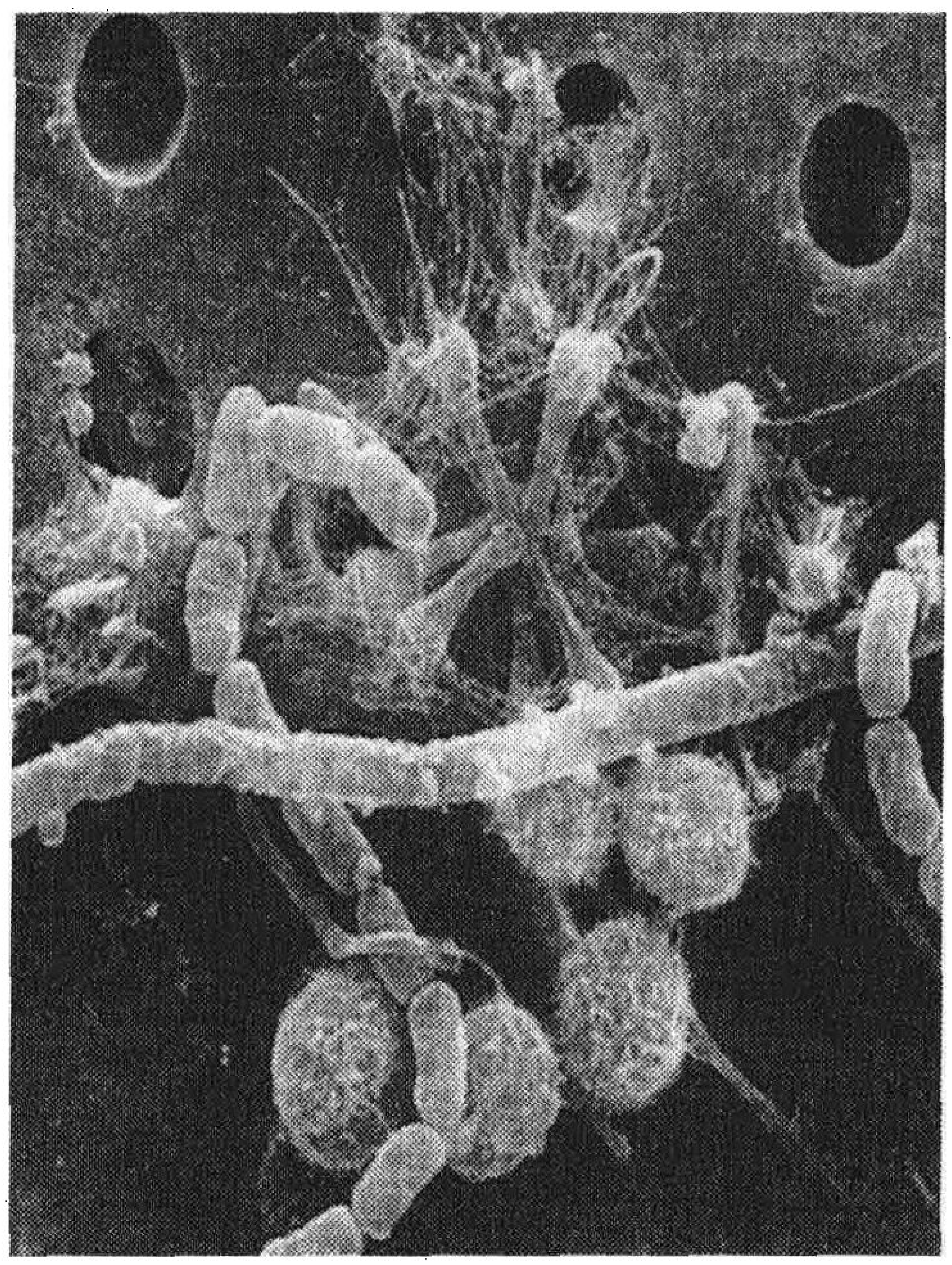
（李明春　译，张　峻　校）

第四部分

免疫学、致病性和宿主反应

20

微生物生长的控制



各种各样物理的、化学的以及生物的手段都被用于控制微生物的生长。上图所示的滤器，截留了多种微生物体。这种滤器常用于从液体中分离微生物或者液体灭菌。

词汇表

氨基糖苷抗生素（aminoglycoside）：包括链霉素在内的一类由糖苷键相连的、含有氨基糖的抗生素

抗生素（antibiotic）：由微生物产生，可以抑制或杀死其他微生物体的化学物质

抗微生物药物抗性（antimicrobial drug resistance）：微生物体后天获得的一种能力，能够在过去敏感的抗菌剂存在下生长

抗微生物剂（antimicrobial agent）：一类能够杀死或抑制微生物体生长的化合物

防腐剂，杀菌剂（antiseptic，germicide）：能够杀死或抑制微生物体生长并且对活体组织没有毒害作用的化学试剂

高压灭菌器（autoclave）：利用高温高压蒸汽杀死微生物体的一种灭菌设备

β-内酰胺抗生素（β-lactam antibiotic）：一类化学结构中含有四元β-内酰胺环的抗生素，如青霉素

杀菌剂（bacteriocidal agent）：一类能杀死细菌的试剂

抑菌剂（bacteriostatic agent）：一类能抑制细菌生长的试剂

广谱抗生素（broad-spectrum antibiotic）：能同时作用于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抗生素

化疗剂（chemotherapeutic agent）：一类能够内服的抗微生物制剂

净化（decontamination）：处理某类物体或非生物体表面，使其能够安全使用的方法

消毒剂（disinfectant）：只能用于非生物体灭菌的抗微生物制剂

消毒（disinfection）：清除非生物物体或表面的微生物体

杀真菌剂（fungicidal agent）：一类能够杀灭真菌的试剂

抑真菌剂（fungistatic agent）：一类能够抑制真菌生长的试剂

融合抑制剂（fusion inhibitor）：一类能够阻断病毒和目标细胞膜之间融合过程的多肽物质

生长因子类似物（growth factor analog）：一类能够阻止生物体吸收生长因子的化学制剂

高效微粒空气过滤器（HEPA filter）：在实验室或工业生产中的通气或排气设备中，用于除去各种微粒（包括微生物）的一种过滤设备

抑制（inhibition）：由于存活个体的减少或微环境的改变而导致的微生物生长的减少

干扰素（interferon）：由被病毒感染的细胞产生的一类细胞因子蛋白质，可以通过信号传导途径诱导邻近细胞中抗病毒基因的转录及抗病毒蛋白质的表达

溶胞（lysis）：细胞丧失完整性并释放内容物的一种现象

最小抑制浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）：阻止微生物生长所需的某种物质的最低浓度

非核苷反转录酶抑制剂（non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor）：NNRTI

核苷反转录酶抑制剂（nucleoside reverse transcriptase inhibitor）：NRTI

巴斯德消毒法（pasteurization）：对热敏感液体加热以杀灭致病菌及致腐菌或降低其数量的方法

青霉素（penicillin）：一类抑制细菌细胞壁合成的抗生素，都含有β-内酰胺环

蛋白酶抑制剂（protease inhibitor）：PI

喹诺酮（quinolone）：一种合成类抗菌化合物，可以与DNA回转酶（又称DNA促旋酶）作用从而阻止细菌DNA超螺旋结构的形成

卫生消毒剂（sanitizer）：一种并不杀死微生物，而是降低其数量至安全水平的制剂

半合成青霉素（semisynthetic penicillin）：天然青霉素经化学修饰后产生的抗生素

杀菌剂（sterilant，sterilizer，sporicide）：能够杀灭各种形式微生物的化学制剂

灭菌（sterilization）：将所有活菌体及病毒从生长培养基中杀死或去除的过程

四环素（tetracycline）：一类结构中含有 4 个苯环的抗生素
杀病毒剂（viricidal agent）：一类阻止病毒复制和活性的试剂
抑病毒剂（viristatic agent）：一类抑制病毒复制的试剂

本章将开始研究微生物与人类的关系。我们将从控制微生物生长的药剂和措施入手。在某些情况下，可以完全消除微生物的生长，这就是灭菌（sterilization），即将存在于生长培养基中的各种活体微生物全部杀死或排除，而用于破坏或杀死细菌的试剂则称之为杀菌剂（bacteriocidal）。但通常情况下，灭菌的目的是很难达到的，我们只能有效地限制微生物体的生长，这一过程则称之为抑菌（inhibition）。用于抑制细菌生长的制剂称之为抑菌剂（bacteriostactic）。

抑制微生物快速生长的措施包括净化（decontamination）和消毒（disinfection）两种。净化就是对一个物体或表面进行处理，使其能够被安全地使用。举一个简单的例子，饭后收拾桌子就是一个净化过程，它可以清除桌子表面的微生物体以及它们生长所需的营养物质。与净化不同，消毒过程并不会将所有的微生物都清除，而仅仅针对病原微生物。可以杀死微生物体或抑制微生物生长的化学及物理试剂称为消毒剂（disinfectant）。漂白剂（次氯酸钠）就是一种典型的消毒剂，常被用来对厨房进行清洁和消毒。

尽管完全阻止微生物的污染和生长（即灭菌）是很难做到的，但在制备微生物培养基或准备外科手术器械等情况下，清除所有微生物体仍然是有必要的。所有净化和灭菌措施的目的都是降低或清除微生物含量（microbial load）和活体微生物的数量。

相对而言，在体内（*in vivo*）对微生物进行控制则要困难得多。临床上所使用的杀菌或抑菌药物必须保证在减缓或阻止微生物生长的同时，对宿主细胞不造成伤害。当然，通过选择各种各样的自然或化学合成药物，这个目的是可以实现的。

本章将首先介绍在体外（*in vitro*）用于控制微生物生长的措施，随后再讨论用于体内的抗微生物药物。

Ⅰ 物理方法控制微生物生长

物理学方法常被用于微生物净化、消毒及灭菌。加热、辐射和过滤等方法可以消灭或除去我们不需要的微生物。这些方法有的可以阻止微生物的生长，有的可以净化一定的区域，还有的可以除去附着在各种材料上的微生物。下面将通过一些应用实例来具体讨论这些方法是如何起作用的。

20.1 加热灭菌

加热法应该是使用最为广泛的一种控制微生物生长的方法，这一节首先讨论加热灭菌的过程。

加热灭菌过程中的计算

所有的微生物都有一个最高生长温度，超过这一温度将导致微生物生存能力的下

降。在高温下，微生物的结构和功能被破坏，这一过程称之为变性（denaturation）。如图 20.1 所示，加热造成的死亡率与时间呈指数函数关系（一级函数），且温度越高死亡越快。这种函数关系说明微生物的死亡速率只与瞬时浓度呈正比，达到特定的死亡率（如 90%）所需时间与初始菌体浓度无关。因此，如果要杀死一个菌群，低温下所需要的时间将会更长。因此每个特定的条件下都应当调整灭菌时间和温度以期达到最佳的灭菌效果。另外，加热的性质也很重要，在一个设定的温度下，湿热比干热的穿透力强，所需的时间也更短。

特定温度下使菌体浓度降低 10 倍（即存活 10%，译者注）所需的时间称为拾-存活时间（decimal reduction time，简称 D），是标志加热灭菌最有用的方法。在食品制备（如烹饪食品和罐装食品）常用的温度范围内，D 和温度呈严格的指数关系。因此 logD 与温度作图可得到一条直线（图 20.2），直线的斜率表示该条件下菌体对热的敏感程度，并且可利用该图求出操作过程（如制罐头的工艺，见 29.2 节）最佳的灭菌时间。

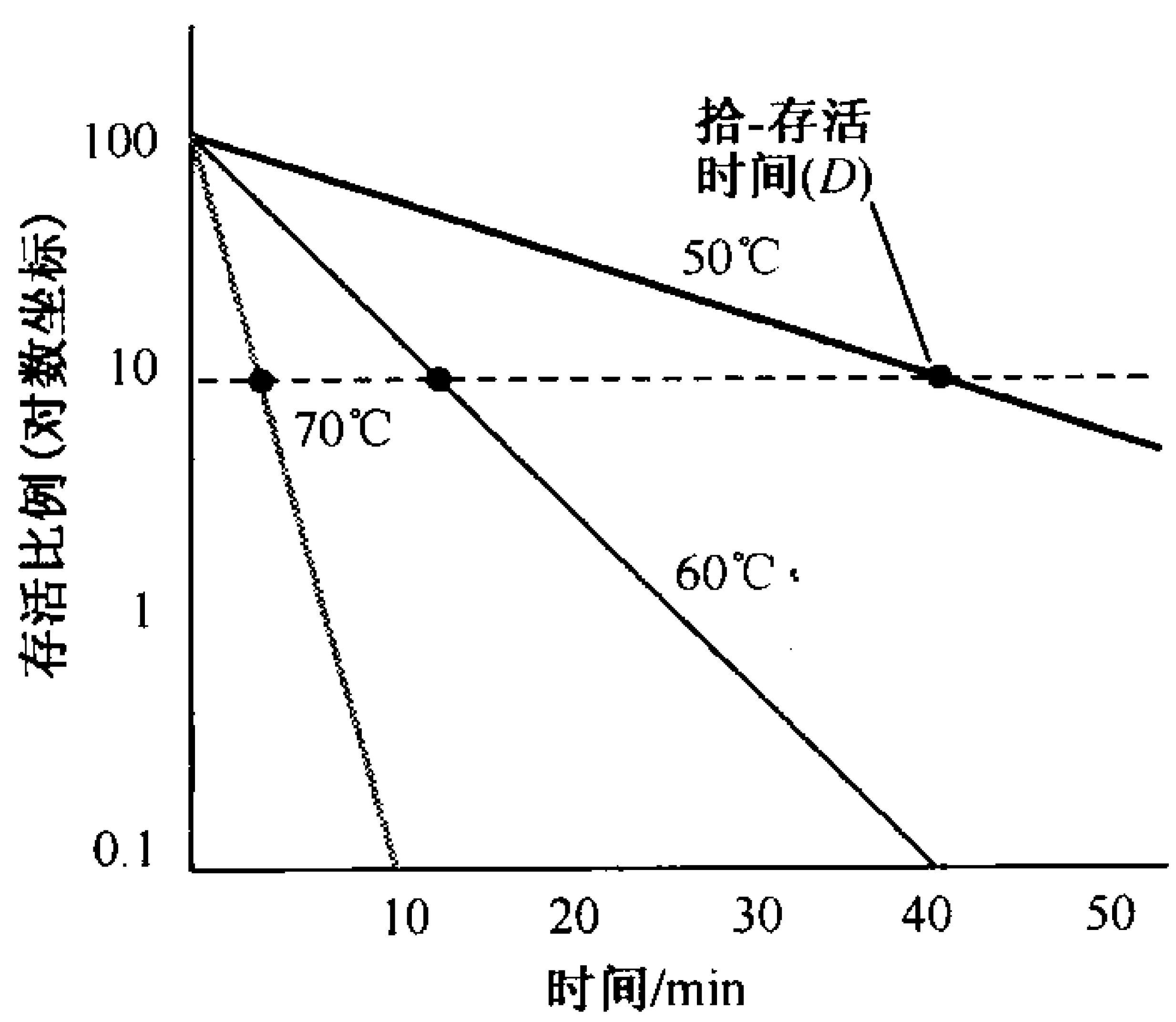


图 20.1　温度对一种嗜中温菌存活力的影响。 图中给出了 3 种不同温度下该嗜中温菌的拾-存活时间。*D* 表示特定温度下使微生物群体存活 10%所需的时间：70℃时，*D*=3min；60℃时，*D*=12min；50℃时，*D*=42min。

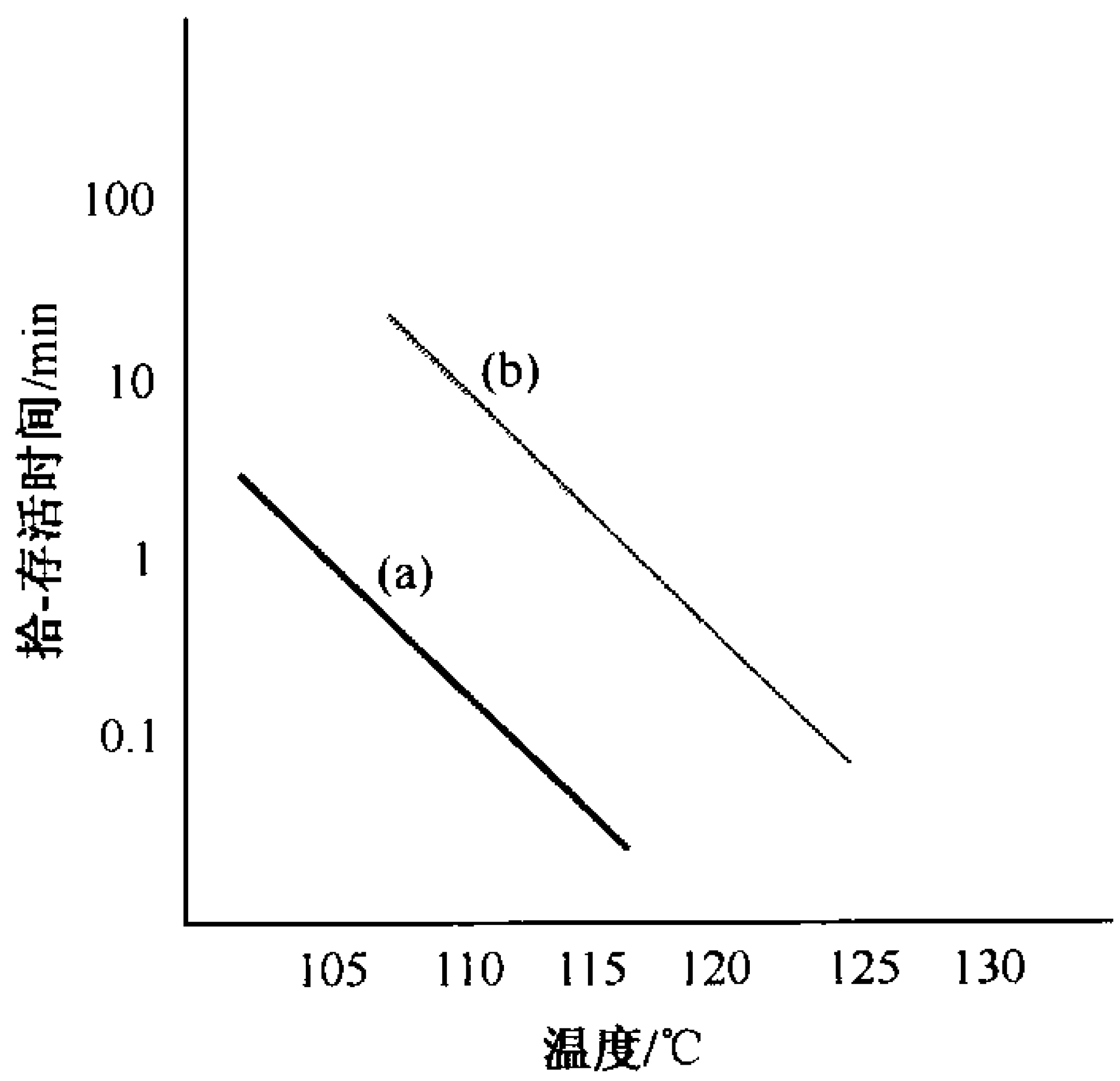


图 20.2　两种不同微生物拾-存活时间与温度的关系图。 所用数据来自与图 20.1 类似的曲线。直线（a）代表的是一种典型的嗜温微生物，其拾-存活时间在 110℃下不到 20s。而直线（b）代表的是一种嗜热微生物，其在 110℃下的拾-存活时间是 10min。

确定拾-存活时间需要进行一系列的活菌计数，所需时间很长。热致死时间（thermal death time）是指特定温度下将细菌全部杀死的时间，这可作为一种衡量微生物热敏感性的简单方法（见 6.5 节）。首先将待测样品制成悬液，加热不同时间后与培养基混合培养，若细菌全部被杀死，培养的样品中便无细菌生长。热致死时间与待测菌的个数有关，细胞数越多，所需时间就越长。固定待测细菌数，可用不同细菌的热致死时间比较它们的热敏感性。

内生孢子及加热灭菌

同一细菌的营养细胞和内生孢子的耐热性有很大差异。高压灭菌器通常使用

121℃，此条件下内生孢子的拾-存活时间是 4～5min，而营养细胞在 65℃下的拾-存活时间仅为 0. 1～0. 5min。因此，有效的加热灭菌应以能杀死内生孢子为准。

在能迅速杀死营养细胞的加热条件下孢子仍能存活。导致孢子耐热性的主要因素是孢子中水的含量和水的状态。在孢子形成过程中，Ca^{2+}、2,6-吡啶二羧酸复合物以及酸溶性芽孢小蛋白（small acid-soluble spore protein，SASP）（见 4. 13 节）的聚集使得原生质体的体积降至最小。这些混合物在细胞内形成胶状物，同时在原生质体外形成皮层，皮层收缩使原生质体进一步萎缩。脱水后的原生质体其含水量仅相当于营养体细胞的 10%～30%。

原生质中 SASP 的浓度及水分的含量决定了芽孢的耐热性。如果前者含量低而后者含量高，则芽孢的耐热性差，反之则耐热性强。由于水分可自由进出孢子，因此，是孢子原生质体内的胶状物起到了排水的作用，而并非孢子外壳没有渗透性。

培养基条件也会影响加热对营养细胞及芽孢的杀灭效果。在酸性 pH 条件下，微生物死亡得更快。西红柿、水果以及泡菜等酸性食物要比玉米、大豆等中性 pH 食物更容易灭菌。高浓度的糖类、蛋白质以及脂肪类物质能够降低热的穿透性，从而增进生物体的耐热能力。而根据生物体种类的不同，高盐浓度既有可能增强也有可能降低生物个体的耐热性。干燥细胞（和芽孢）要比湿润的细胞更耐热，因此，对干燥的物体进行加热灭菌需要更高的温度和更长的时间。

高压灭菌器

高压灭菌器（autoclave）是允许高压气体进入的密闭设备（图 20. 3）。高压水蒸气的温度在沸点以上，可以杀死耐热的内生孢子（图 20. 3a）。通常使用的压力为 1. 1kg/cm² [即 15 磅/每平方英寸（Ib/in²）]。此时水蒸气的温度是 121℃，该温度条件下的灭菌时间通常是 10～15min（图 20. 3b）。

若物体较大，热量传入内部的速度较慢，则应适当延长灭菌时间。大量液体灭菌时也存在同样的问题。值得一提的是，杀死微生物的并非是高压灭菌器中的压力而是高压下的高温水蒸气。

巴斯德消毒法

巴斯德消毒法（pasteurization）是减少牛奶等热敏感食品中微生物含量的过程。它得名于首次使用该法来控制酒变质的路易斯 · 巴斯德（Louis Pasteur）。巴氏消毒法不同于普通灭菌法，它不能杀死所有的微生物。最初，巴氏消毒法主要是为了除去牛奶中的致病菌，尤其是导致结核病、布鲁氏杆菌病、Q 热和伤寒的微生物。尽管现在这些病原菌在食物中已不常见，巴氏消毒法仍被用于阻止单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）、弯曲杆菌属（*Campylobacter*），沙门氏菌属（*Salmonella*）及大肠杆菌（*Escherichia coli*）O157：H7（见 29. 7～29. 10 节）等病原菌在日常食品和饮料中的扩散。此外，巴氏消毒法还能减缓有机物质的腐败速度，有效地延长易腐液体的货架期（见 29. 1 节和 29. 2 节）。

牛奶的巴氏灭菌法是使牛奶通过热交换器，控制牛奶在与热源接触的管道中的流量和流速，使其在 71℃维持 15s，然后迅速冷却。该过程称为巴氏瞬间灭菌法（flash pasteurization）。

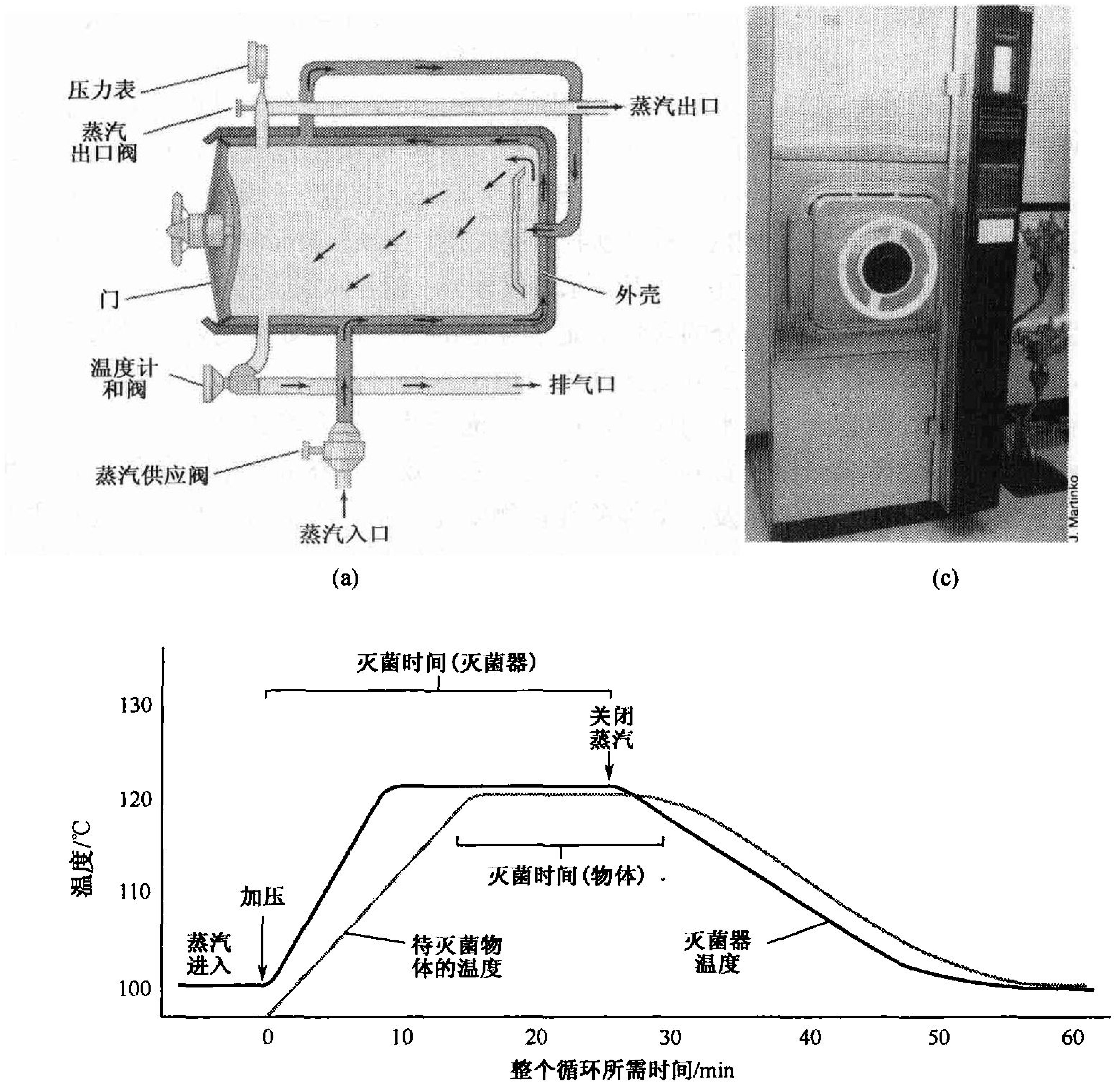


图 20.3 用高压灭菌器灭菌。（a）高压灭菌器中水蒸气的流动。（b）典型的高压灭菌器循环。图示较大物品的灭菌，物体温度升高的速度低于灭菌器。（c）现代研究用高压灭菌器。注意它的压力-锁门以及右侧面板的自动循环控制系统。其右侧是蒸汽的进出装置。

牛奶也可在大容器中被加热至63～66℃，并维持30min。这种被称为巴氏批量灭菌（bulk pasteurization）的方法，升温和降温速度较慢，牛奶在高温中的时间长，效果并不太好。而巴氏瞬间灭菌法能在较好地保持原味的同时更有效地杀死耐热有机体且可连续进行，适于大规模灭菌操作，从而被许多牛奶厂广泛采用。

概念检查

灭菌能杀死所有的微生物，加热灭菌是最常用的灭菌方法。灭菌温度的选择应以能杀死最耐热的有机体（多为内生孢子）为准。常用灭菌设备是高压灭菌器，该设备使用温度在100℃以上的高压水蒸气灭菌。巴氏消毒法主要用于除去致病菌和减少微生物含

量，从而延长物品的储存时间。

◆ 为什么加热灭菌是一种有效的灭菌方法？

◆ 对可能含有内生孢子的物质灭菌，哪些步骤是必需的？

◆ 比较一下对微生物培养基进行灭菌和对苹果汁进行巴氏消毒有什么不同？

20.2 辐射灭菌

热只是电磁辐射的一种形式。微波、紫外辐射、X 射线、γ 射线和电子等都属于电磁辐射（见 10.4 节），并且都能影响微生物的生长。不同形式的电磁辐射有着不同的作用机制。如微波的抗菌作用，至少部分在于它的热效应。而波长为 220～300nm 紫外线的作用机制则完全不同，紫外线的能量足以使 DNA 断裂，从而引起暴露的微生物死亡。这种“近可见”紫外光多用于物体表面、空气和一些与水一样不吸收紫外光的物质的消毒。生物实验室操作台中一般都有紫外杀菌灯，可对使用后的工作台进行表面消毒（图 20.4）。紫外线不能穿透固体、不透明体和能吸光的表面，因此仅限于物体的表面消毒。

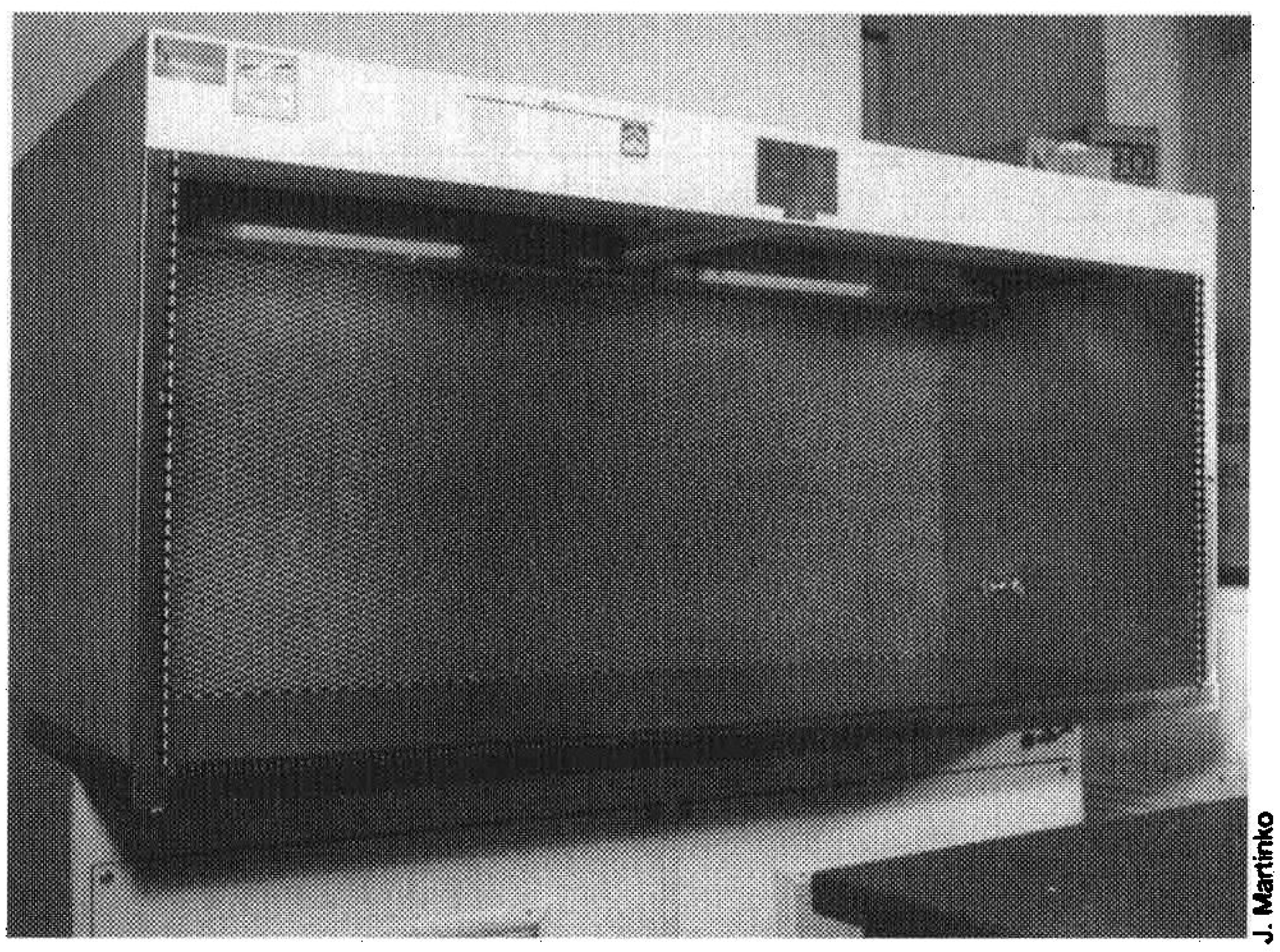


图 20.4　生物安全工作台。该工作台带有一个紫外放射源（汞蒸气灯）用于内部表面的消毒。

电离辐射

电离辐射是一种高能的电磁辐射。辐射粒子与某些分子撞击后，可激发这些分子产生离子或其他活性分子。电离辐射可产生电子 e^-、羟自由基（OH·）和氢自由基（H·）（见 6.16 节），这些活性分子可降解或改变 DNA 和蛋白质等生物多聚体。电离作用使 DNA 和蛋白质等重要分子降解，可引起被辐射细胞的死亡。这类辐射源都有潜在的灭菌作用。

辐射的单位是伦琴（roentgen），它表示由辐射源释放能量的多少。实际应用时，如灭菌过程中，常用辐射吸收剂量（absorbed radiation dose）作为衡量标准，单位是

拉德（rad）（1rad＝100erg/g＝10^{-2}Gy）或戈瑞（Gy）（1Gy＝100rad）。不同微生物对辐射的抵抗力也不同。表 20.1 列出了使某些微生物数量减少 10 倍（即存活 10%）或生物体的某些生物功能减弱 10 倍的辐射剂量。

表 20.1　微生物体和生物功能的辐射敏感性

种类或功能	微生物类型	D10[a]/Gy
肉毒梭状芽孢杆菌 *Clostridium botulinum*	革兰氏阳性、厌氧、产孢子细菌	3300
破伤风梭状芽孢杆菌 *Clostridium tetani*	革兰氏阳性厌氧产孢细菌	2400
枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*	革兰氏阳性好氧产孢细菌	600
鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*	革兰氏阴性菌	200
短小乳芽孢杆菌 *Lactobacillus brevis*	革兰氏阳性菌	1200
抗辐射奇异球菌 *Deinococcus radiodurans*	革兰氏阴性抗辐射细菌	2200
黑曲霉 *Aspergillus niger*	霉菌	500
酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*	酵母菌	500
口蹄疫病毒	病毒	13 000
柯萨奇病毒	病毒	4500
酶类失活	—	20 000～50 000
杀昆虫	—	1000～5000

a. D10 表示使原有微生物个数或生物功能减少 10 倍所需的辐射量。

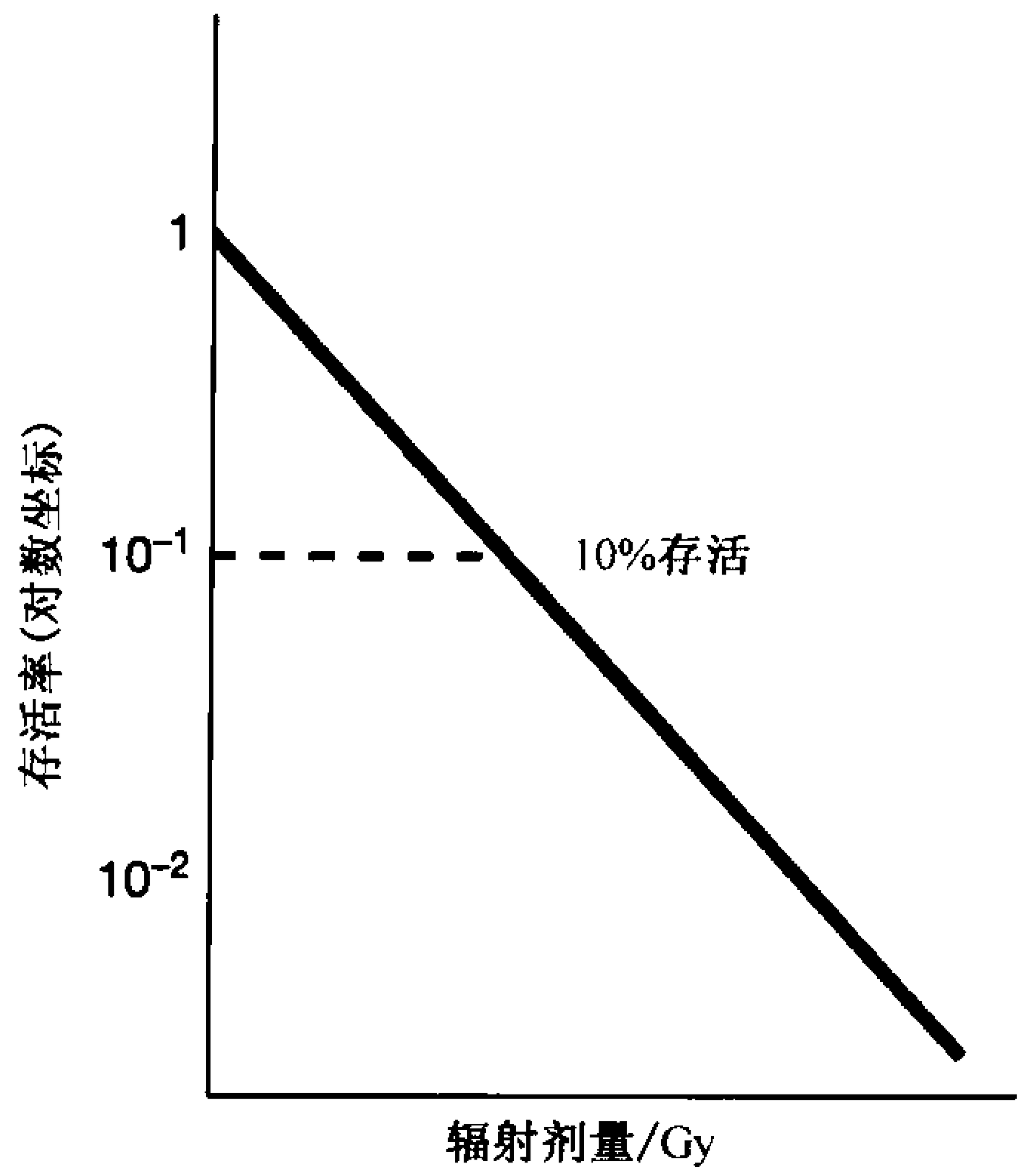


图 20.5　存活组分和辐射剂量之间的关系。$D10$ 可以从图中所示数据中推导出。不同生物的辐射剂量具有显著区别。

举例来说，使鼠伤寒沙门氏菌（*Samonella typhimurium*）等革兰氏阴性菌数量减少 10 倍（decimal reduction 或 D10）的辐射剂量一般是 200Gy。表 20.1 中的数据与加热灭菌中的拾-存活时间（见 20.1 节）的意义相似：以存活率相对于以 Gy 表示的辐射量作半对数图，可得到严格的直线关系（图 20.5）。

一个标准的辐射致死剂量（killing dose）被定义为某种微生物的 12 倍 $D10$。对肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）的内生孢子来说，致死剂量为 39 600Gy（表 20.1），而对鼠伤寒沙门氏菌来说，致死剂量则只有 2400Gy。原因在于前者的 $D10$ 比后者要大得多。一般情况下，微生物比高等生物耐电离辐射的能力强，人的辐射致死剂量仅为 10Gy！

辐射的应用

电离辐射的辐射源主要有 X 射线仪、阴极射线管和放射性核素。这些辐射源可产生 X 射线或 γ 射线，这两类射线都有较高的能量和穿透力，能有效抑制固体或液体中

微生物的生长。使用最多的辐射源是能产生 γ 射线的放射性元素。常用的同位素是^{60}Co和^{137}Cs，它们均为核裂变的副产品，价格较便宜。

辐射多用在食品工业和医疗设备的灭菌上。美国药物和食品管理局已经批准使用辐射对外科医疗器械、实验室器具、药品甚至移植器官（表 20.2）进行消毒。但是，由于辐射灭菌设备的成本及危险性，这种灭菌方法仅限于大型的工业应用或者某些非常特殊的用途。食物和食品也可以用辐射法灭菌（见 29.2 节）。通过调节辐射剂量，辐射法还可以被用于巴氏灭菌以及害虫防治等方面。

表 20.2　利用辐射法灭菌的医疗和实验室用品

移植组织	药物	医疗和实验用具
软骨	氯霉素	一次性实验用具
肌腱	氨苄青霉素	组织培养基
皮肤	四环素	注射器
心（脏）瓣膜	阿托品	外科手术设备
	疫苗	缝合用品
	药膏	

辐射法已经被世界卫生组织批准用于食物消毒，特别是那些容易被微生物污染的调味品和鲜肉制品，如汉堡、鸡肉等。而在美国，该方法已经被批准用于肉类加工的消毒（见 29.2 节）。在许多国家用于类似目的辐射灭菌技术已经成熟并被广泛接受，而在另一些国家中则发展得十分缓慢。因为人们担心辐射会引起污染，改变食品的营养价值，产生有毒或致癌物质，辐射后的食品中会出现异味等。

概念检查

合适的条件下，电磁辐射可有效地控制微生物的生长。紫外线主要用于物体表面和不吸收紫外线的物质，如空气、水的清毒。若条件合适，电离辐射可穿透固体和吸光物质，从而被广泛地用于医疗和食品工业的灭菌和消毒过程。

◆ 比较在利用辐射处理微生物的过程中，拾-存活值和致死剂量有什么不同？

◆ 为什么在食品灭菌中，电离辐射比紫外辐射更加有效？

20.3 过滤灭菌

加热法是最常见、最有效的液体灭菌法，但热敏感液体的灭菌只能用过滤（filtration）的方法。过滤器（filter）是一种带有小孔的装置，它可以使气体和液体通过却阻止了微生物，从而达到灭菌的目的。灭菌中所涉及的微生物大小不等，它们的直径大的可达 10μm 以上，小的仅为 0.3μm。历史上，曾用过滤法验证和分离过病毒，其直径大都在 25～200nm（见 9.2 节）。图 20.6 列出了 3 种主要的滤器类型。

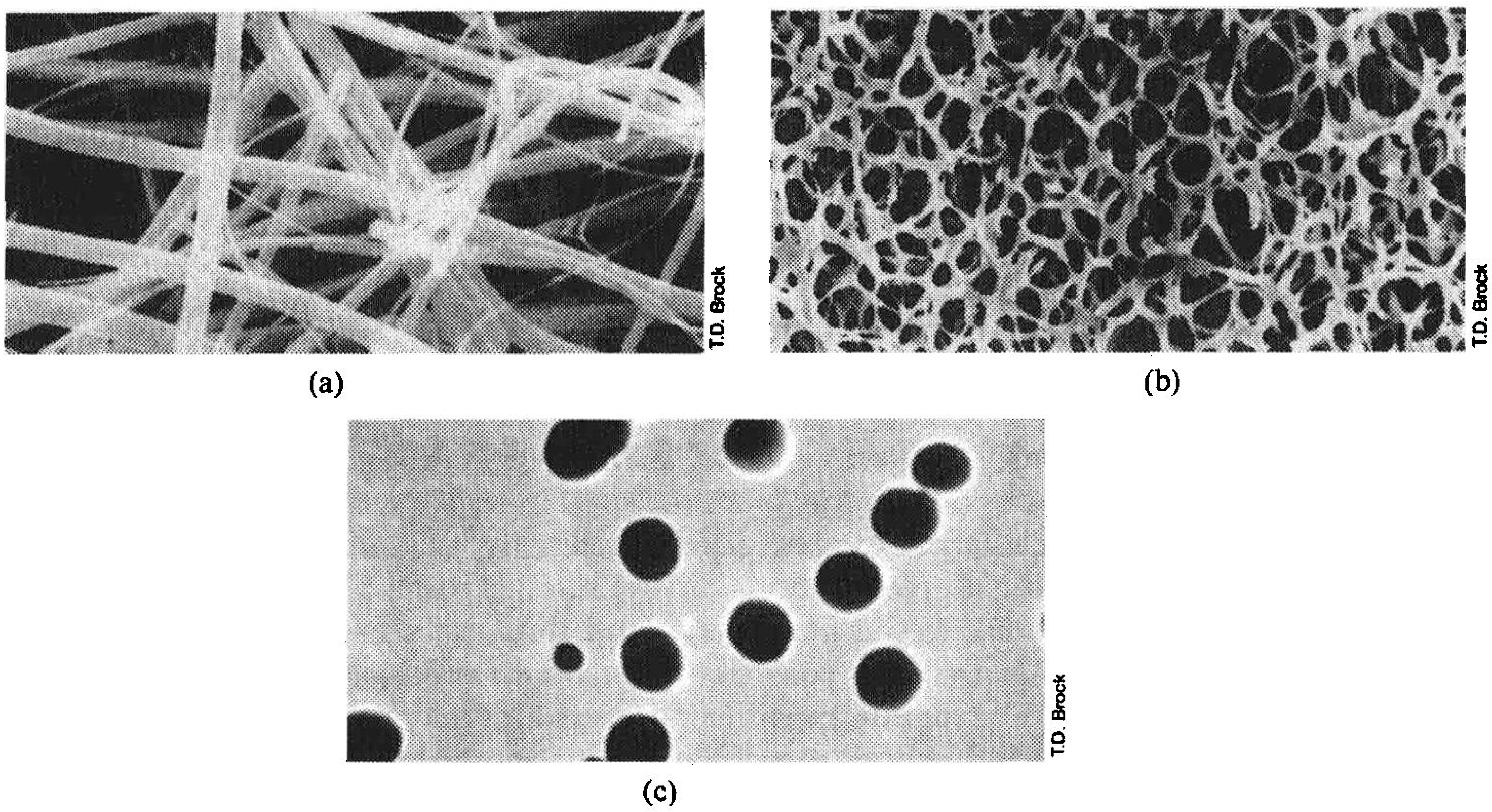


图 20.6 微生物滤器。图中所示的是（a）深度滤器（b）使用方便的膜滤器和（c）核孔滤器的结构。深度滤器用于前过滤，用于除去液体中大量的悬浮颗粒。膜滤器在实验室和工业上都有应用，由于它的孔径和孔数灵活可变并且经济廉价，所以几乎被用于各种用途的过滤。核孔（或称核径）滤器常用在对微生物样品的显微观察中。过滤后将液体中待观察的微生物截留在滤器表面以便于观察。

深度滤器

深度滤器（depth filter）是最简单的一类滤器。它是由纸、石棉或玻璃纤维交错而成的纤维状薄片（图 20.6a），可以将颗粒截留在网状纤维结构中。深度滤器有许多孔，可用于前过滤器（prefilter），以除去液体中较大的颗粒，防止后期过滤时出现阻塞。同时这种滤器也可以用于工业过程中的空气除菌（见 30.4 节）。家庭中使用的空调也常常使用简单的深度滤器阻挡灰尘、孢子及各种致敏颗粒。

深度滤器在生物安全方面也有很重要的应用。例如，在细胞培养、微生物培养操作以及生长培养基的制作过程中，要求操作者和实验材料都尽量避免污染。因此，这些操作都要求在生物安全工作台中进行，这样的工作台均带有一个高效空气净化（high-efficiency particular air，HEPA）过滤器（图 20.4）。

“无尘间”的建造可以看作是 HEPA 过滤器的大规模应用，我们可以把一个房间同空气中的各种颗粒隔离开来，就像一间特殊的生物安全实验室（见 24.4 节）那样。对 0.3μm 以上的颗粒，HEPA 过滤器的效率至少可以达到 99.97%，它可以有效除去气流中的大小颗粒。典型的 HEPA 过滤器是由一片经过防水处理的硼硅酸盐（玻璃）构成，为了增加表面积，过滤器被做成褶皱状并填入到一个起支撑作用的框架当中，以防止过滤器破碎。HEPA 过滤器有各种形状和尺寸，小的仅有几平方厘米，用于真空净化器；大的有几平方米，用于生物防护罩（图 20.4）和房间空气净化系统。

膜滤器

微生物实验室中最常用的液体灭菌滤器就是膜滤器（membrane filter）（图 20.6b）。膜滤器通常由醋酸纤维或硝酸纤维等高强度的复合物构成，膜上具有大量的小孔。在制造这些材料的过程中，通过调整聚合条件，我们可以控制膜滤器上孔的尺寸（也就是通过滤孔的分子大小）。与深度滤器不同的是膜滤器起到筛子的作用，将微生物留在滤器的表面。膜滤器是一种开放结构，有 80%～85%的面积与外界相通，这种开放性也使得液体或气体的流速较快。

图 20.7 所示的就是利用膜滤器对液体灭菌的过程。使用之前，滤器的各部分分开灭菌，使用时在无菌条件下再组装起来。图 20.7 a 所示的装置适用于小量液体。当需要对大量热敏性液体进行灭菌时，常常将膜滤器排成筒状放入不锈钢套筒中，这样的装置在制药工业中常常用到。

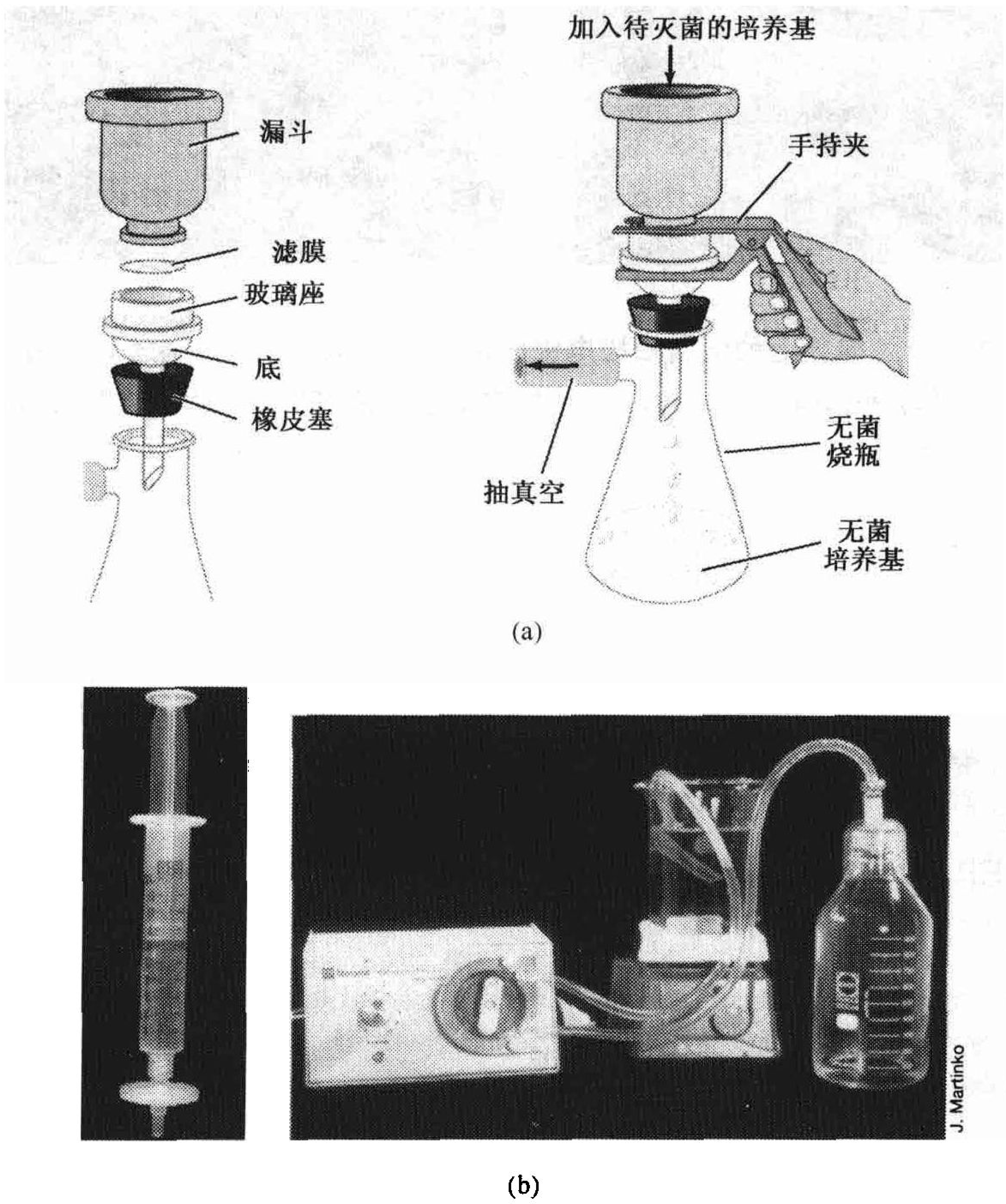
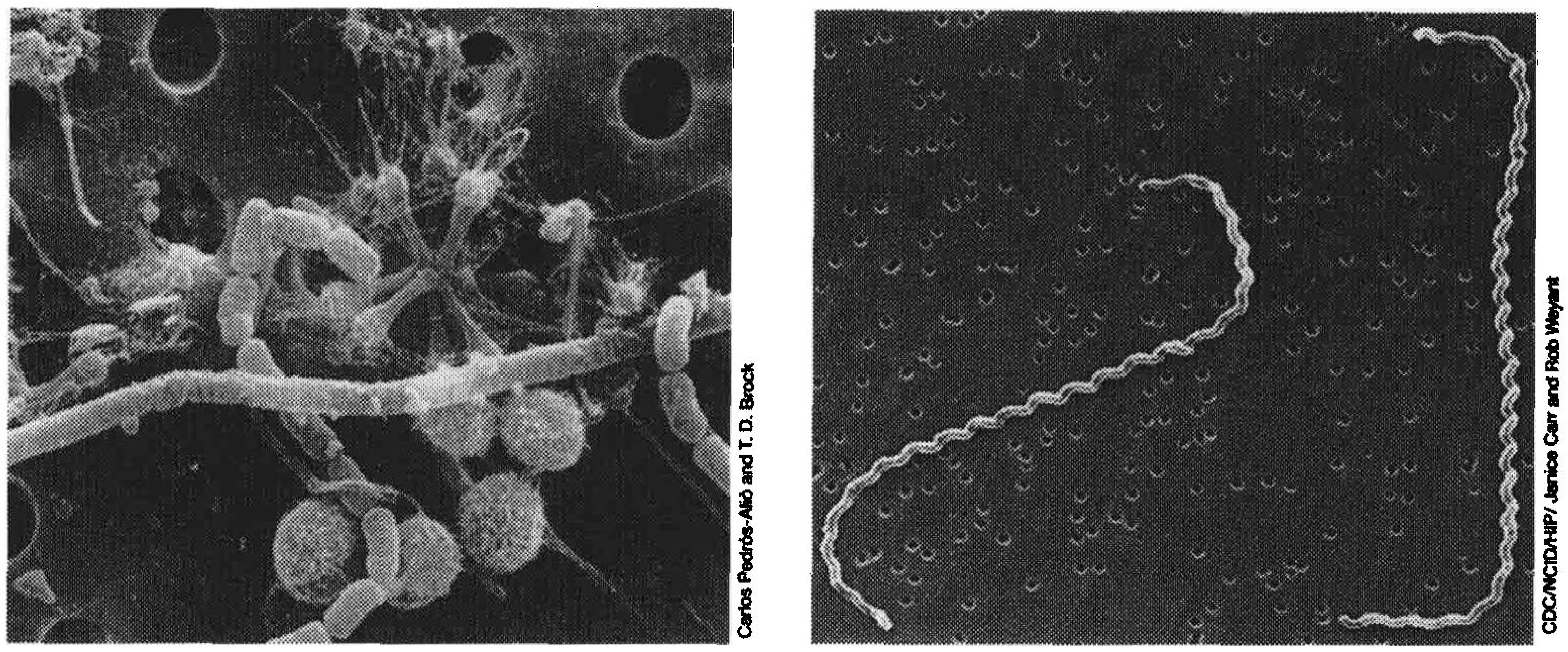


图 20.7　膜滤器。（a）可重复使用的膜滤器装置的组装。（b）灭菌后组装好的膜滤器装置。左边的装置用于少量液体的灭菌，右边的装置适用于大量液体的过滤灭菌。

对中小体积液体进行灭菌的膜滤器在科研或医学实验室中是很常见的（图 20.7 b）。过滤过程中常使用注射器、水泵或真空泵等产生压力迫使液体透过滤膜进入无菌收集器中。

另一种常见的滤器是核孔滤器（nucleation track 或 nucleopore filter）。用厚度为 10μm 的聚碳酸酯层经核辐射处理后，会在特定的部位出现损伤，用腐蚀性化学物质再使这些损伤穿孔即可得到核孔滤器。滤器上孔的大小可用腐蚀液的浓度和处理时间来控制。典型的核孔滤器孔的大小统一且与聚碳酸酯层垂直（图 20.6c）。这种滤器常用在微生物的扫描电镜观察中。过滤后将液体中待研究的微生物留在滤器表面便于进行显微观察（图 20.8）。



(a)　　　　(b)

图 20.8　截留在核孔滤器膜上的细菌扫描电镜照片。（a）水生细菌和藻类。孔直径为 5μm。（b）问号螺旋体（*Leptospira interrogans*）。这种微生物直径约为 0.1μm，长度约为 20μm。图中滤膜孔径为 0.2μm。

概念检查

滤器用于除去空气或液体中的微生物。深度滤器（包括 HEPA 滤器），常用于除去液体或气体中的微生物及其他污染物。膜滤器被用于热敏液体的灭菌而核孔滤器常被用于制备显微观察用的微生物样品。

◆ 描述 HEPA 滤器在医院空气净化中的应用。

◆ 为什么膜滤器被用于热敏性液体的灭菌?

Ⅱ 化学方法控制微生物生长

在家庭中、车间里以及实验室中，化学物质常被用于控制微生物的生长。能杀死或抑制微生物生长的化学物质称为抗微生物剂（antimicrobial agent)。这类物质可以是人工合成的，也可以是天然产物。能杀死微生物的试剂称致死剂（cidal agent)。根据它们杀死微生物的种类不同可分为杀菌剂（bacteriocidal agent)、杀真菌剂（fungicidal agent)和杀病毒剂（viricidal agent)。不杀死微生物，只起抑制其生长作用的试剂称为抑制剂（static agent)。特异性不同的抑制剂分别称为抑菌剂（bacteriostatic agent)、抑真菌剂（fungistatic agent）和抑病毒剂（viristatic agent)。

20.4 化学物质对生长的控制

不同抗微生物剂的选择性毒力（selective toxicity）不同。有些抗微生物剂的作用无专一性，对所有细胞都有相似作用。另外一些则是有选择性的起作用，如对微生物要比对动物组织表现出更大的毒力。这类有选择性毒力的抗微生物剂可作为化疗剂来治疗传染病，它的特点是在不损害宿主细胞的前提下特异性地杀死病原微生物，本章后面部分将会详细的描述。这里先来讨论那些毒力相对广泛，在体外抑制微生物生长方面非常有用的化学制剂。

抗微生物剂对生长的影响

将抗微生物剂加入到对数生长期的细菌中可观察到 3 种不同的效应：抑菌（bacteriostatic）、杀菌（bacteriocidal）和溶菌（bacteriolytic）作用（图 20.9）。抑菌剂通常与核糖体结合，从而可以抑制蛋白质的合成。但这种结合并不紧密，当抑菌剂浓度较低时，其便会与核糖体分开，细菌可恢复生长（图 20.9a）。许多抗生素便是这种作用机制，将在 20.6～20.9 节讨论。杀菌剂能杀死细菌，但不引起溶菌（图 20.9b），它可以与靶细胞结合，且这种结合不能通过稀释作用解除。溶菌剂可通过细胞裂解（lysis）而杀死细胞，可由细胞数目的减少和加入溶菌剂后液体变混浊观察到（图 20.9c）。溶菌剂包括能抑制细胞壁合成的抗生素，如青霉素（见 4.8 节，20.8 节）和一些破坏原生质膜的试剂。

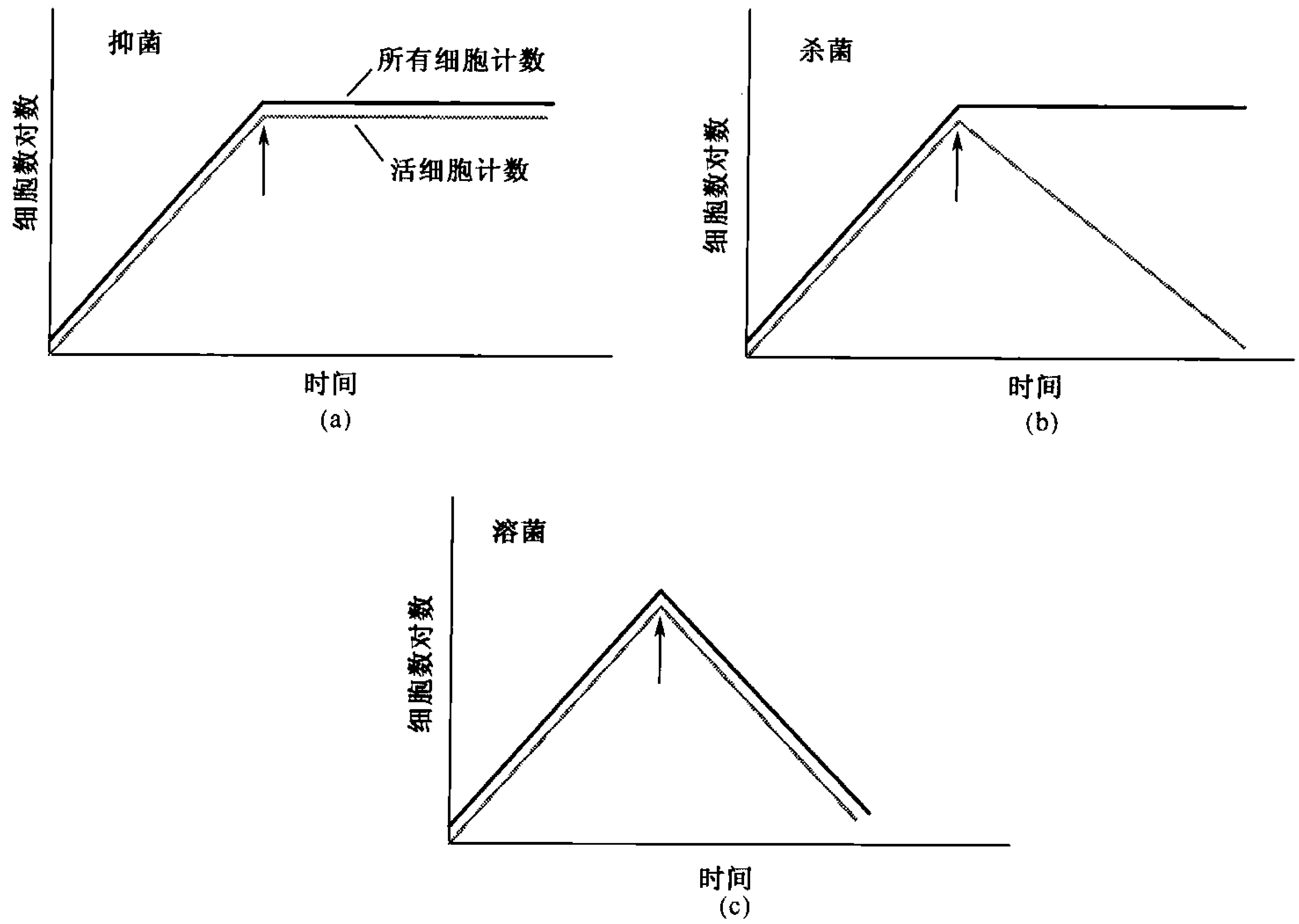


图 20.9　三类抗微生物制剂的作用。在箭头所示的时间向对数生长期的培养物中加入生长抑制物。注意活菌数和细菌总数之间的关系。

抗菌活性的测定

测定抗菌活性就是确定抑制微生物生长所需抗微生物剂的最小量。该值被称为最低抑制浓度（minimum inhibitory concentration），用 MIC 表示。确定 MIC 的方法是：在一系列含有培养基的试管中加入不同浓度的抗微生物剂并接种细菌，培养一段时间后，使微生物不能生长的最低浓度即为 MIC。微生物的生长可用浊度判断（图 20.10）。这种简便、有效的测定过程称为试管稀释法（tube dilution technique）。

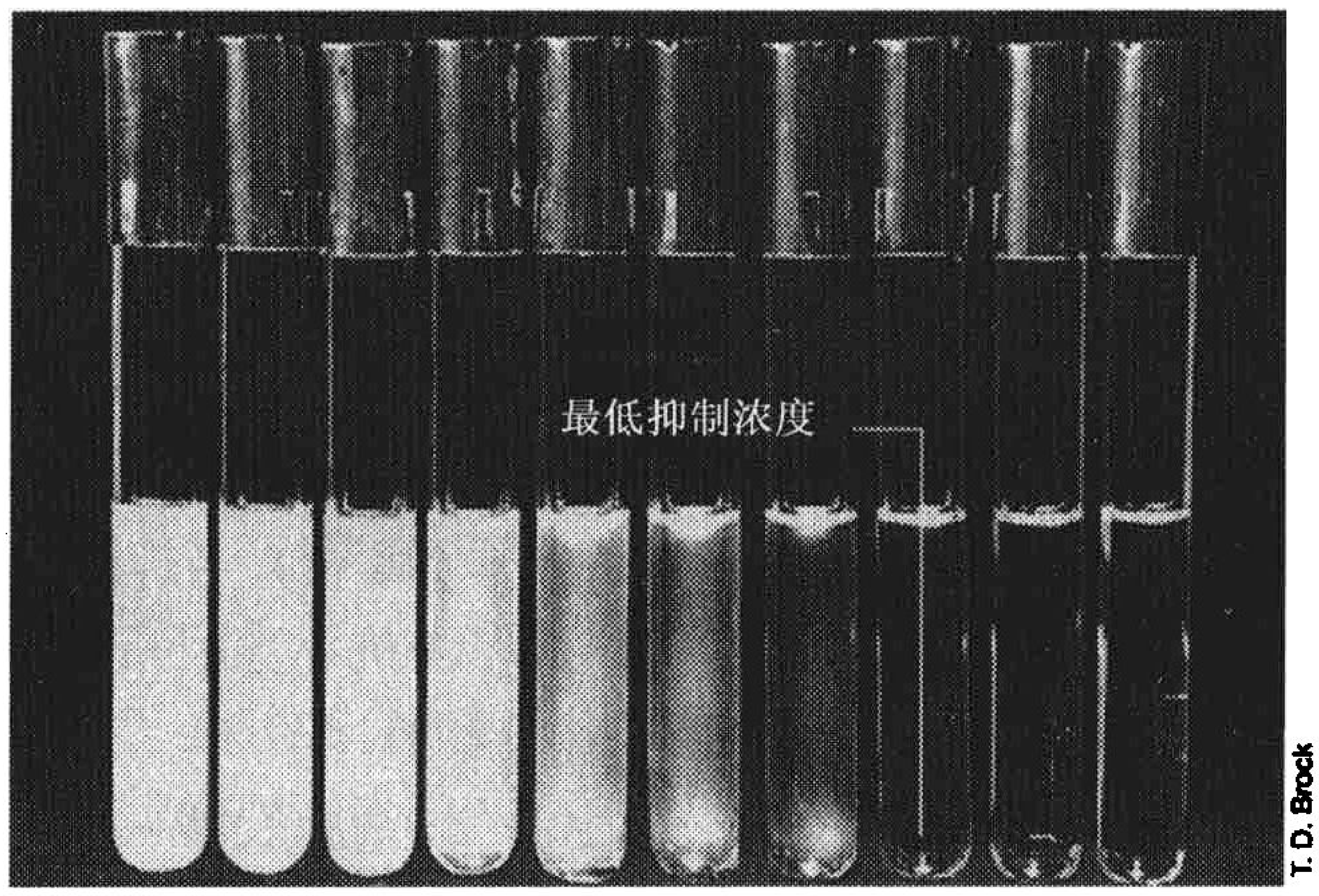


图 20.10 用试管稀释法测定抗生素的 MIC。向培养基中加入一系列浓度递增的抗生素，接菌培养。抗生素浓度低于 MIC 的试管中细菌仍能生长。

对于试剂而言，MIC 不是固定值，它受待测菌的性质、接种量、培养基成分、培养时间和培养条件（温度、pH、通气等）的影响。固定各种影响因素，可以比较不同抗微生物剂对特定微生物的作用效果。酚系数法（phenol coefficient method）是一种标准的比较方法，在使用相同的测试菌、培养基以及培养条件的前提下，将各种试剂的 MIC 与苯酚的 MIC 进行比较，取它们的比值作为衡量的标准。

另一种常用的研究抗微生物剂作用的方法是琼脂扩散法（agar diffusion）（图 20.11）。在琼脂平板上涂布待测细菌，将含有不同抗生素的滤纸片放在琼脂表面。培养过程中，抗生素扩散到培养基中，距离滤纸片越远，抗生素的浓度就会越低。在某一部位，其浓度恰为 MIC。此距离以外的区域便会有细菌生长，从而得到以 MIC 处为半径的抑菌圈（zone of inhibition）。抑菌圈的大小与抗生素的浓度和有效性呈正比。这种方法常用于检测病原菌的抗生素敏感性（见 24.3 节）。

概念检查

化学物质常用于控制微生物的生长。能杀死微生物的试剂称为致死剂，抑制微生物生长的则称为抑制剂。化学药品的有效性可用 MIC 来衡量。

◆ 同为抗菌制剂，抑制剂、致死剂和溶菌剂之间有何区别?

◆ 简述某种特定抗菌剂的最小抑制浓度是如何确定的?

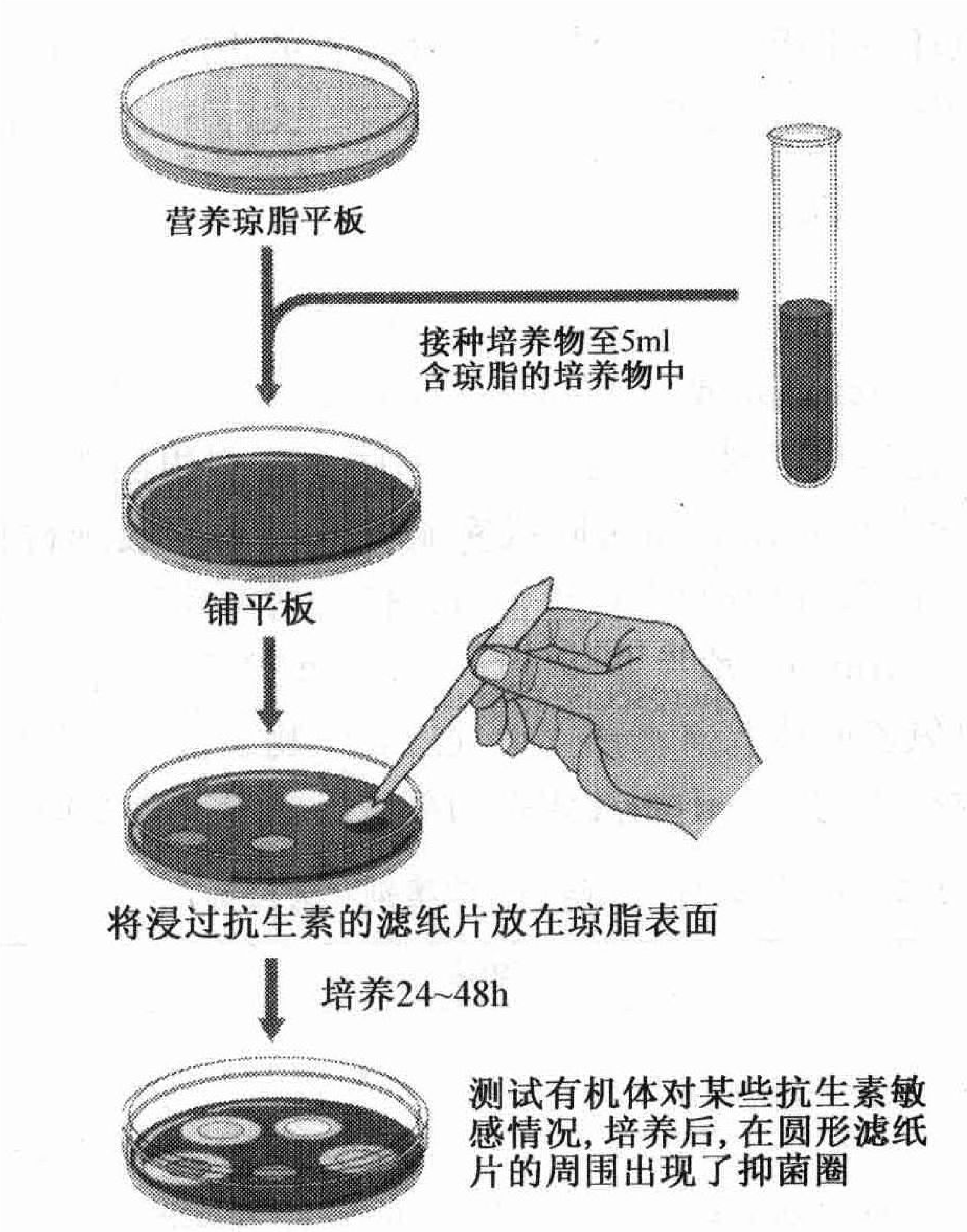


图 20.11　抗生素活力的测定。利用琼脂扩散法确定抗生素的活性。

20.5　外用化学抗微生物制剂

化学抗微生物制剂分为两类。一类指用于控制非人类病原微生物生长的抗微生物制品。这类制剂通常用于控制那些影响动物健康的微生物，也常被用于控制食品、空调制冷机、纺织制品、纸制品及油罐等工业产品中的微生物污染（表 20.3）。

表 20.3　工业中使用的抗微生物化学物质

行业	化学物质	用途
造纸	有机汞、酚类[a]、甲基异噻唑啉酮	防止微生物在制造过程中生长
皮革	重金属、酚类[a]	使终产物中含有抗微生物剂
塑料	阳离子去污剂	防止微生物在以水为分散相的塑料中生长
纺织	重金属、酚类[a]	防止微生物腐化暴露于环境中的织物，如雨棚和帐篷
木材	重金属、酚类[a]	防止木质结构的腐烂
金属	阳离子去污剂	防止细菌在水相切割乳胶中的生长
石油	汞、酚类、阳离子去污剂	防止微生物在石油制品的回收和储存过程中生长
空调	氯气、酚类[a]	防止微生物（如军团菌）在冷却塔中生长
电力	氯气	防止微生物在冷凝器和冷却塔中生长
核工业	氯气	防止耐辐射微生物在核反应器中生长

a. 重金属（汞和砷）化合物和酚类化合物会产生危害环境的废弃物并且会威胁人体健康。

第二类指能够在无机环境中阻止人类病原微生物生长的物质。这类化学抗微生物制剂又被分为杀菌剂（sterilant)、消毒剂（disinfectant)、去污剂（sanitizer）和防腐剂(antiseptic)。

杀菌剂

化学杀菌剂（chemical sterilant 或 sterilizer 或 sporicide）能够毁灭各种生命形式的微生物，包括内生孢子。化学杀菌剂被广泛应用于那些无法利用加热（见 20.1 节）或辐射（见 20.2 节）进行灭菌的情况。当医院或实验室需要对热敏感材料，如温度计、透镜设备、聚乙烯试管、导管，以及呼吸计等可重复使用的医疗设备进行消毒时，常常使用冷灭菌法（cold sterilization)。冷灭菌通常在一个类似高压灭菌锅的密闭装置中进行，环氧乙烷、甲醛、过氧乙酸或双氧水蒸气等气态化学物质被通入其中，对里面的材料进行灭菌，而那些不耐高压的设备则用液体杀菌剂进行消毒（表 20.4)。

表 20.4 防腐剂、杀菌剂、消毒剂和去污剂

试剂	用途	作用模式
防腐剂		
乙醇（60%～85%的乙醇或异丙醇水溶液）[a]	局部防腐	溶解酯类物质并能使蛋白质变性
酚类化合物（六氯酚、三氯苯氧氯酚、氯二甲苯酚、氯己啶）[b]	用于生产肥皂、洗涤剂、化妆品、身体除臭剂及进行局部消毒	破坏细胞膜
阳离子去污剂，特别是季胺化合物（氯化苯甲烃铵）	用于生产肥皂、洗涤剂及进行局部消毒	与细胞膜中的磷脂发生相互作用
过氧化氢[a]（3%溶液）	局部防腐	氧化剂
含有碘载体复合物的碘溶液[a]（聚烯吡酮碘）	局部防腐	碘化酪氨酸残基、氧化剂
奥替尼啶	局部防腐	破坏细胞膜
硝酸银	防止由奈瑟氏双球菌感染所导致的新生儿致盲	蛋白质沉淀剂
杀菌剂，消毒剂和去污剂[c]		
乙醇（60%～85%的乙醇或异丙醇水溶液）[a]	医疗器具及实验室的表面消毒	溶解酯类物质并能使蛋白质变性
阳离子去污剂（季胺化合物）	对医疗器具、食品及日常用品进行消毒和清洁	与细胞膜中的磷脂相互作用
氯气	在供水纯化过程中消毒	氧化剂
含氯化合物（氯胺、次氯酸钠、高氯酸钠）	对日用品及食品工业设备和供水系统的消毒和清洁	氧化剂
硫酸铜	泳池及供水系统中的藻类消毒剂	蛋白质沉淀剂
环氧乙烷（气体）	对塑料等温度敏感材料进行杀菌	烷基化试剂
甲醛	3%～8%溶液可作为表面消毒剂，37%溶液（福尔马林）或者蒸气可用作杀菌剂	烷基化试剂
戊二醛	2%溶液可用作高水平消毒剂或杀菌剂	烷基化试剂
过氧化氢[a]	其蒸气可用作杀菌剂	氧化剂
含有碘载体复合物的碘溶液[a]（强力碘）	医疗器具及实验室表面消毒	碘化酪氨酸残基

续表

试剂	用途	作用模式
氯化汞[b]	实验室表面消毒	与—SH 基团结合
OPA（邻苯二甲醛）	医疗器具的高水平消毒	烷基化试剂
臭氧	饮用水消毒	强氧化剂
过氧乙酸	其用液用作高水平消毒剂或杀菌剂	强氧化剂
酚类化合物	实验室表面消毒	蛋白质变性

a. 根据作用浓度、作用时间及作用形式的不同，乙醇、过氧化氢和碘附类物质既可以用作防腐剂、消毒剂，也可以用作去污剂或者杀菌剂。

b. 重金属（汞和砷）化合物和酚类化合物会产生危害环境的废弃物并且会威胁人体健康。

c. 除了那些含有重金属元素的物质以外，许多水溶性的抗微生物制剂都可以用作日常用具及厨房的去污剂，但要注意在与食物接触前，这些制剂必须被清洗干净。

消毒剂、去污剂和防腐剂

消毒剂（disinfectant）能够杀死微生物，但不能有效作用于内生孢子，常被用于无机物体。如，乙醇和阳离子清洁剂这类医用消毒剂常被用于医疗设施中地板、桌椅、墙壁等处的消毒，而普通的消毒剂则被用于家庭、泳池和水纯化设备的处理（表 20.4）。

去污剂（sanitizer）可以将微生物的数量降低至安全水平，但无法完全杀死微生物。食用去污剂（food contact sanitizer）被广泛用于食品加工设备表面的清洁，如搅拌和烹饪设备、餐具和各种用器等。而非食用去污剂（non-food contact sanitizer）则被用于橱柜、地板、墙壁、地毯以及洗衣间等处的表面处理。

防腐剂（antiseptic 或 germicide）可以杀死微生物或抑制其生长，它们对活体组织是无毒的。大多数此类化合物被用于手部清洁或处理外部伤口（表 20.4）。在某些情况下，特定的防腐剂也能有效地起到消毒作用。这类产品属于控制类药物，其使用必须得到美国食品药品监督管理局（FDA）的允许。

抗微生物功效

这些抗微生物化学制剂的功效受到许多因素的影响。例如，许多消毒剂可以被有机物所中和，从而降低其浓度并影响杀菌效果。此外，病原体常常会形成颗粒或者被包裹在生物膜（biofilm）中（见 19.3 节），要穿透这些障碍，化学制剂的作用时间将会延迟，甚至会因为无法穿透障碍而完全失去功效。

只有防腐剂能够有效地杀灭细菌的内生孢子。同营养期细胞相比，内生孢子的水分含量很低，新陈代谢作用也很缓慢（见 20.1 节和 4.13 节），因此对抗微生物制剂的抵抗能力较强。但某些特殊的营养期细胞，如引起肺结核的结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*），其对普通的消毒剂也有很强的抵抗力，这是因为它具有一种蜡状的细胞壁（见 12.23 节和 26.5 节）。因此，要有效地使用抗微生物制剂，就必须根据实际情况对症下药。

概念检查

杀菌剂、消毒剂和去污剂可用于非生命物质及材料的消毒。防腐剂可用于活体组织的杀菌。这类物质在商业、医疗保健和工业中都有广泛应用。

◆ 区分杀菌剂、消毒剂、去污剂和防腐剂。

◆ 哪些消毒剂常被用于水体的杀菌？为什么这些消毒剂对人体是无害的？

Ⅲ 用于体内的抗微生物制剂

许多合成的或天然的抗微生物制剂被用于控制体内组织的微生物感染。这些化合物的出现是感染疾病治疗史上的一次革命。

20.6 合成类抗微生物药物

前几节主要讨论了在体外控制微生物生长的化学试剂。虽然其中的消毒剂可用于皮肤杀菌，但大多数抗微生物剂对人体毒性太大，不能直接在体内使用。能在内部组织中使用来控制传染病发生的试剂，称为化疗剂（chemotherapeutic agent），它们在临床医学、动物治疗及农业等方面发挥着举足轻重的作用。

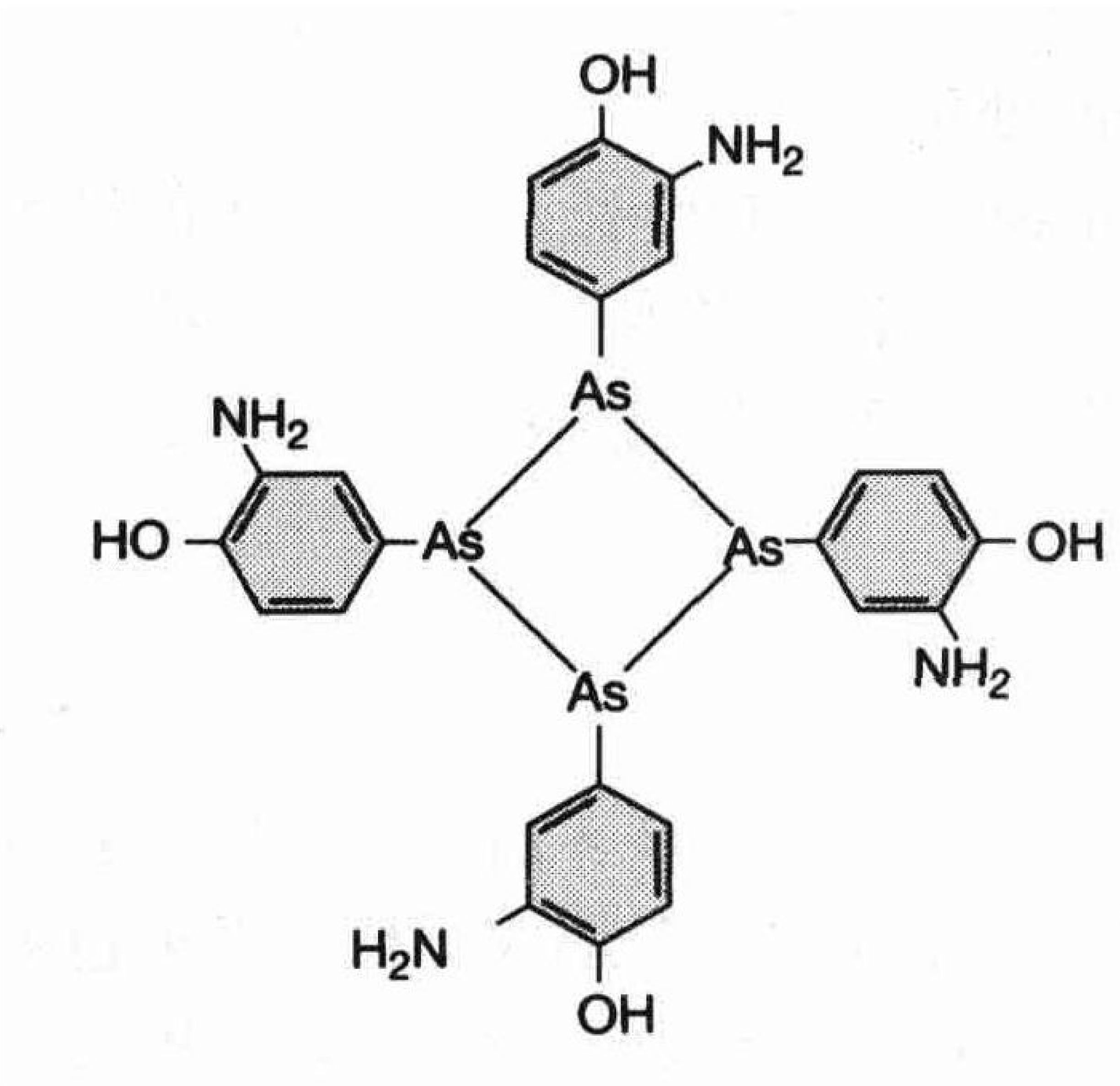


图 20.12 洒尔佛散。这种含砷复合物是第一种有实际功效的抗微生物化学治疗药物。它在20世纪初曾被用来治疗梅毒。

化疗剂的研究工作开始于德国科学家 Paul Ehrlich。早在20世纪初，Ehrlich 便提出了选择毒力（selective toxicity）的概念，即能够特异性地杀死或抑制病原微生物的生长，而对寄主无负面影响。为了寻找一种只针对病原体起作用的“神奇子弹”，他检测了大量化学染料的选择性毒力，并首次发现了一种有效的抗微生物药品——洒尔佛散（Salvarsan）。它是一种含砷化合物，主要用于治疗梅毒（图 20.12）。

化疗剂是根据它们的结构（图 20.13）、作用机制（图 20.14）及抗菌谱（图 20.15）来进行分类的。在世界范围内，每年有超过 500t 的各种化疗剂被生产出来（图 20.16）。抗微生物制剂大体上分为两类：合成制剂（synthetic agent）和抗生素（antibiotic）。这里我们主要介绍合成制剂。抗生素将在下一节中讨论。

生长因子类似物

我们曾在 5.1 节中了解的生长因子是指微生物本身不能合成、只能加入到培养基中

抗生素分类	亚类	举例
I. 碳水化合物类	纯糖 氨基糖苷 (orthosomycins) *N*-糖苷 *C*-糖苷 糖脂	野尻霉素 链霉素 扁枝衣霉素 链霉素 万古霉素 默诺霉素
II. 大环内酯类	大环内酯抗生素 多烯抗生素 安沙霉素 大环四重内酯	红霉素 杀假菌素 利福平 四抗菌素
III. 醌类及相关复合物	四环素 Anthracyclines 萘醌 苯醌	四环素 阿霉素 放线菌素 丝裂霉素
IV. 氨基酸和肽类似物	氨基酸衍生物 β-内酰胺类抗生素 色素肽 缩肽 螯合形成肽	环丝氨酸 青霉素、 杆ceftriaxone菌素 放线菌素 缬氨霉素 博来霉素
V. 含氮杂环化合物	核苷酸抗生素	多氧菌素
VI. 含氧杂环化合物	多醚抗生素	莫能菌素
VII. 脂环族化合物	环链烷衍生物 固醇类抗生素	放线菌酮 梭链孢酸
VIII. 芳香族化合物	苯衍生物 压缩的芳香族 芳香乙醚	氯霉素 灰黄霉素 新生霉素
IX. 脂肪类化合物	含磷化合物	磷霉素
X. 喹诺酮化合物	4-喹诺酮 氟-4-喹诺酮	萘啶酮酸 诺氟沙星
XI. 噁唑烷酮	环状内酯	2-噁唑烷酮

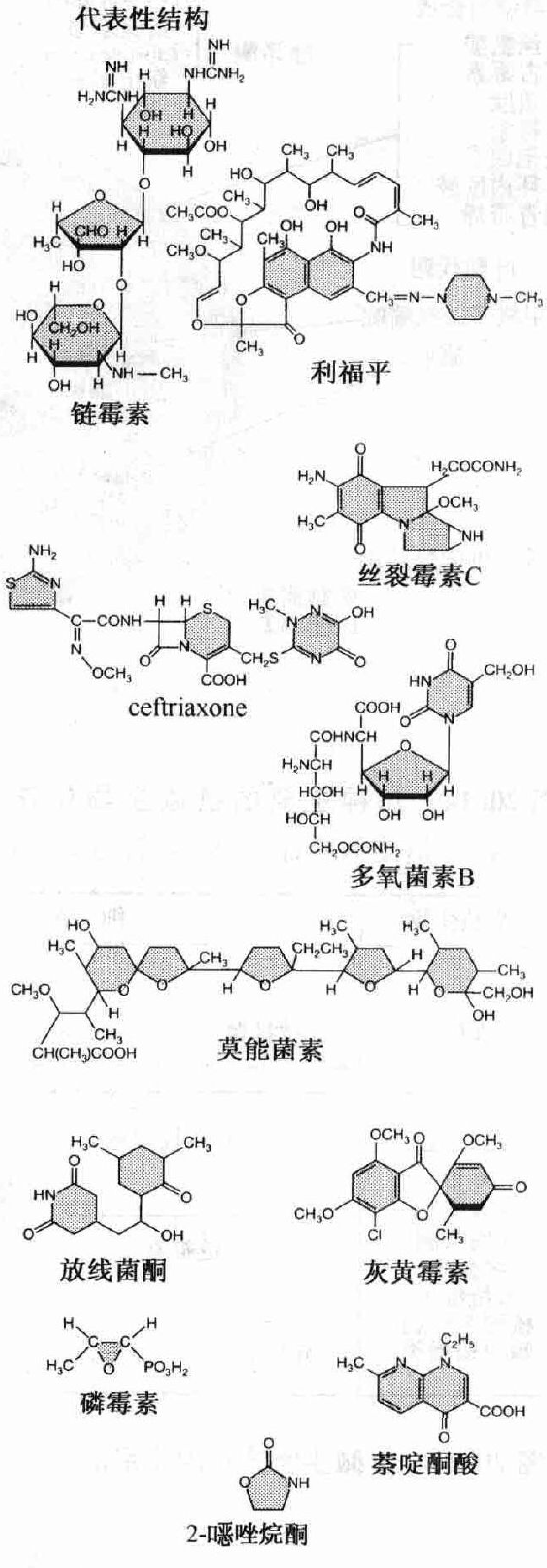


图 20.13　抗细菌化疗剂。图中的这些制剂按照化学结构分类。每一组都给出了一种代表性物质。

供微生物生长所需的特殊化学物质。与生长因子相似并能阻碍其利用的物质称为生长因子类似物（growth factor analog)。它在结构上与生长因子类似，但二者在细胞中的作用则完全不同。已知的类似物主要是各种维生素、氨基酸、嘌呤、嘧啶及其他复合物。我们首先讨论细菌生长因子类似物。治疗病毒及真菌感染的类似物我们将在 20.10 节和 20.11 节中讨论。

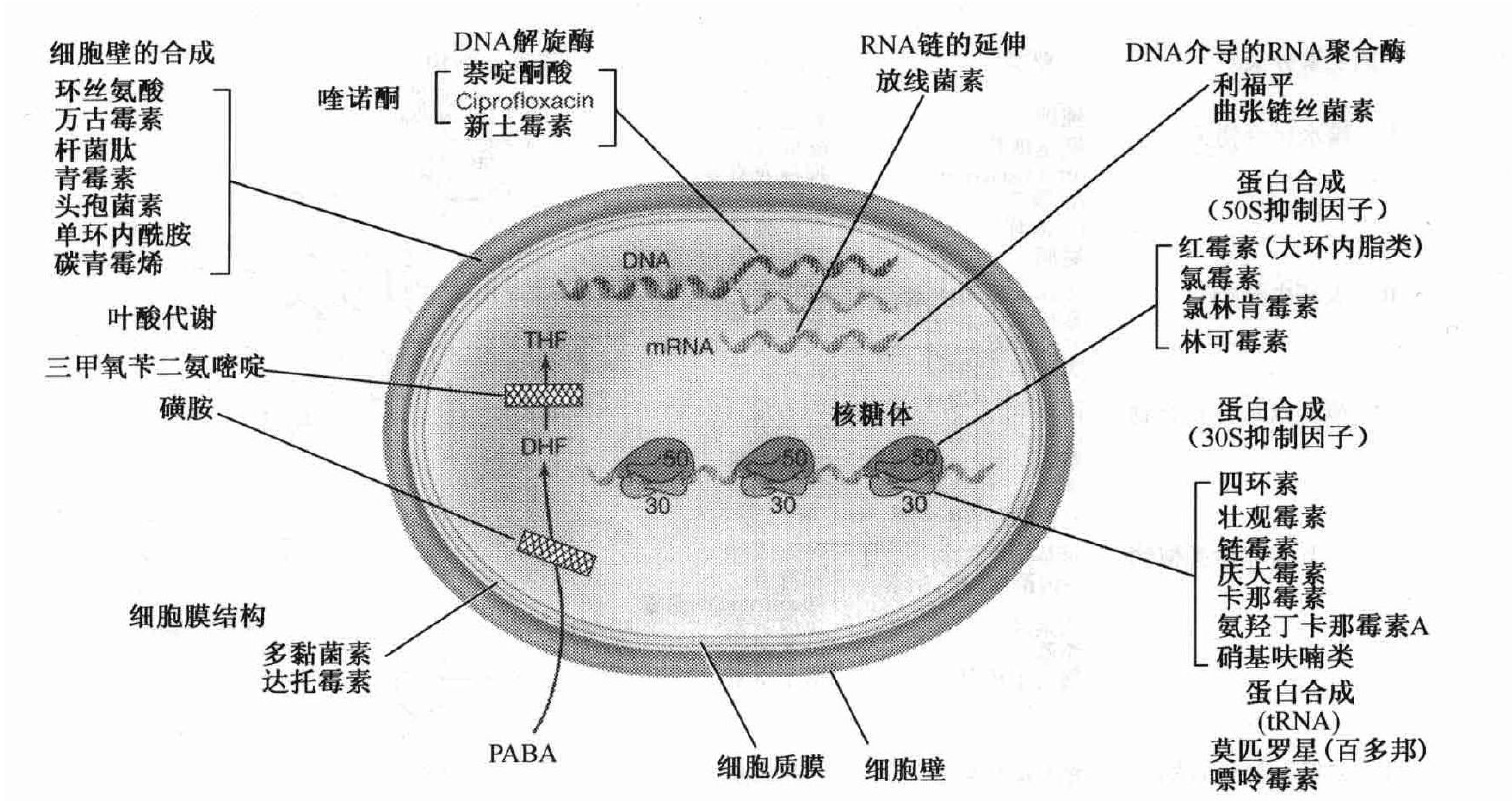


图 20.14 几种主要的抗微生物化疗剂的作用模式。 THF，四氢叶酸；DHF，二氢叶酸；mRNA，信使 RNA；tRNA，转运 RNA。

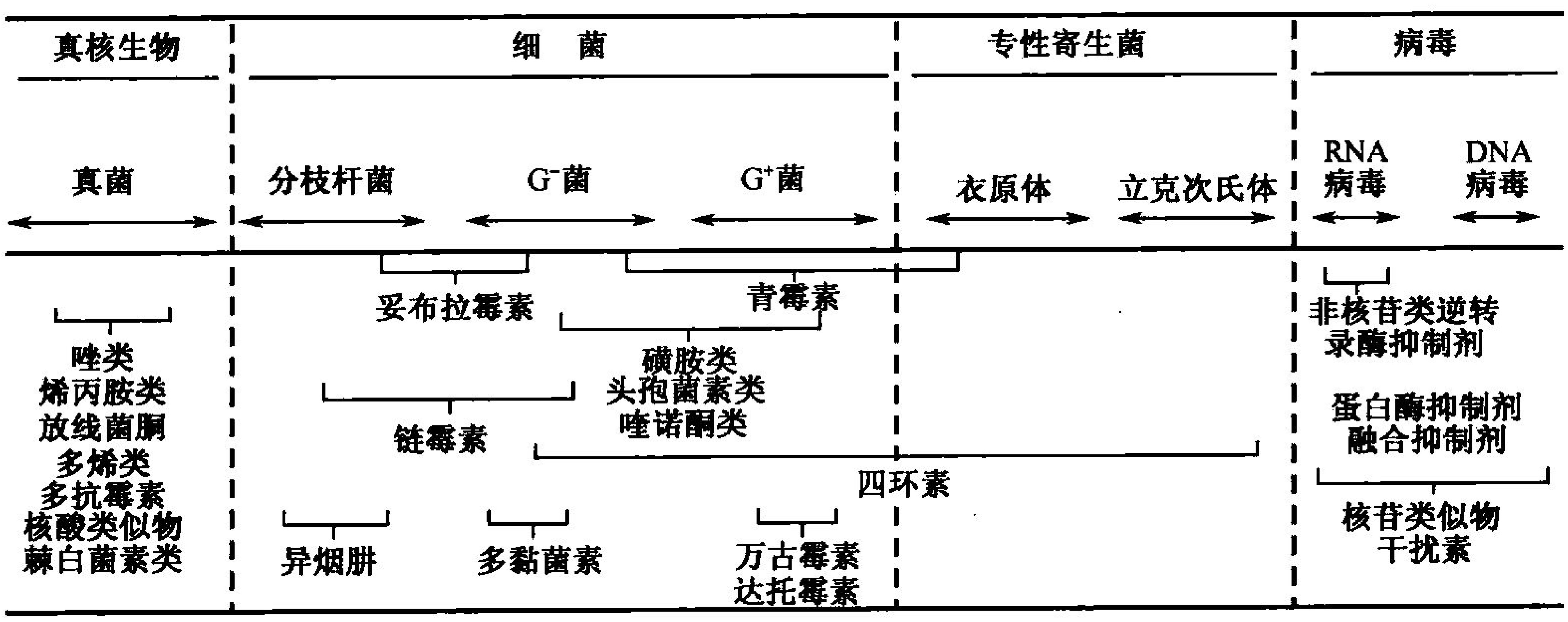


图 20.15 抗微生物药物的作用谱。 各类抗微生物化疗剂都有各自不同的抗菌谱（或抗病毒谱）。

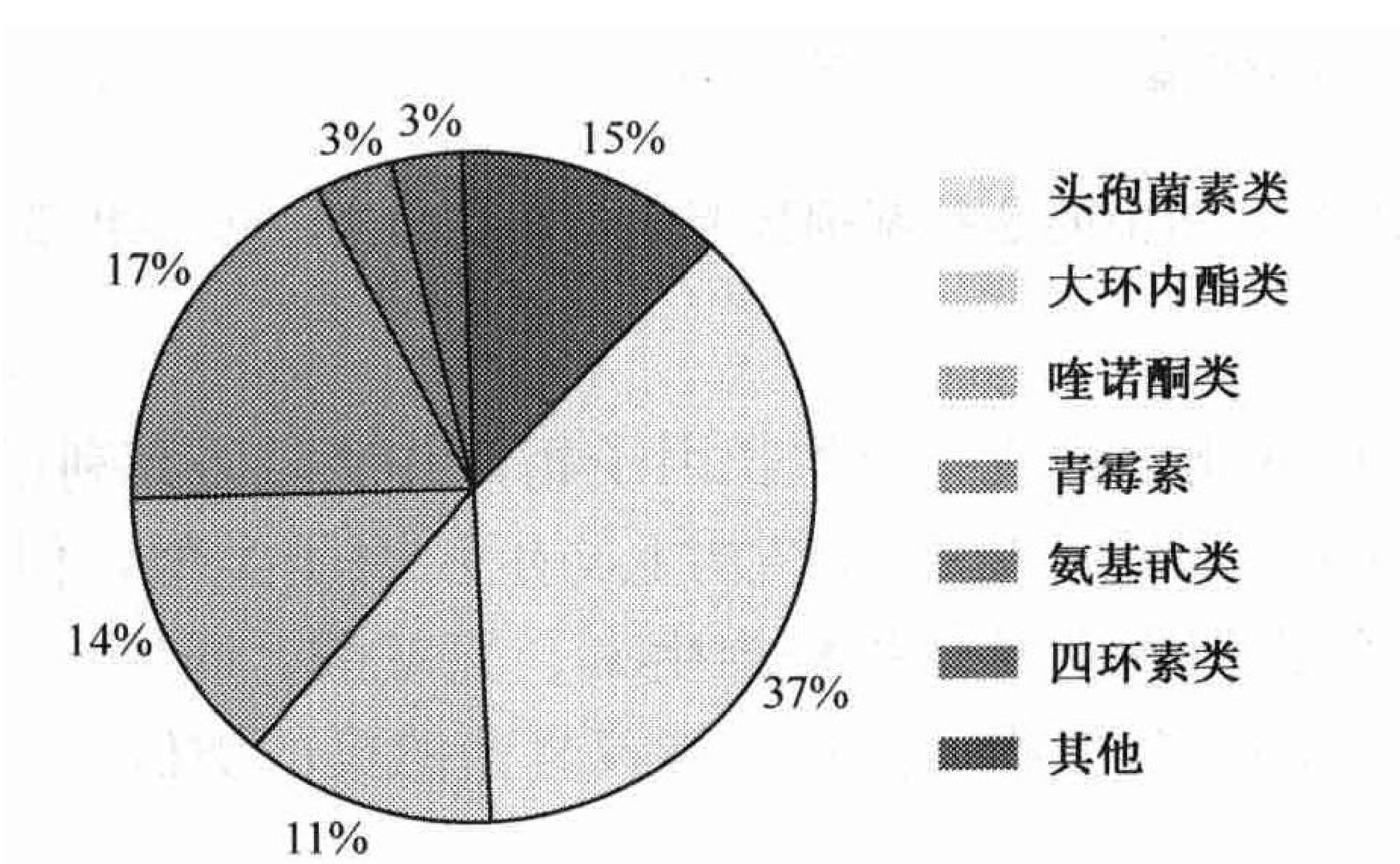


图 20.16 全世界每年抗生素的产量及用量。 每年生产的抗微生物化疗剂超过 500t。

磺胺类药物

磺胺类药物（sulfa drug）是最早被广泛应用的生长因子类似物，它是由 Gerhard Domagk 在 20 世纪 30 年代发现的，可以特异性地抑制细菌的生长。磺胺类药物的首次发现促使人们利用实验动物大规模筛选治疗传染病的化学物质。

最简单的磺胺类药物是对氨基苯磺酰胺，它是细菌合成叶酸的前体——对氨基苯甲酸（p-aminobenzoic acid）的结构类似物（图 20.17）。磺胺的加入可以阻断叶酸的合成，进而抑制核酸的合成。高等生物从食物中获得叶酸，而微生物的叶酸则是由自体合成的，因此，磺胺只对细菌细胞起作用。由于曾被广泛用于治疗链球菌的感染（见 26.2 节），目前在临床中针对磺胺的抗药现象已经相当普遍，那些抗性微生物已经进化出利用外源叶酸的能力（见 20.12 节）。但将磺胺甲基异噁唑（sulfamethaxazole）和新明磺（trimethorim）混合使用，其治疗效果仍然很好。这是因为前者是一种临床上很有用的磺胺类药物，而后者是一种相关的叶酸合成竞争物，这两种药物的混合物对叶酸的合成途径产生了一连串的阻断作用。要对这种混合制剂产生抗性，则必须在同一生物体内产生两种不同的突变，这无疑是非常困难的。

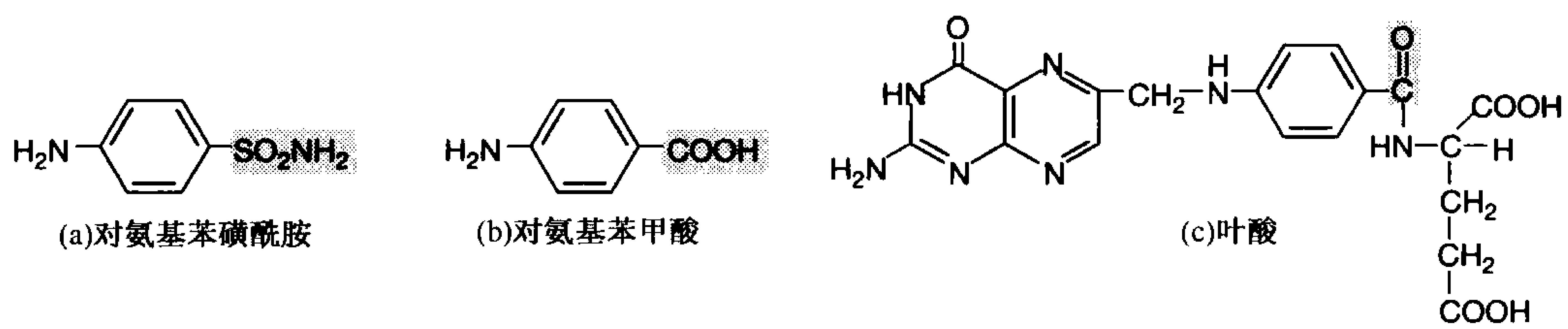


图 20.17 磺胺类药物。(a) 对氨基苯磺酰胺是最简单的磺胺类药物。(b) 它是叶酸的前体——对氨基苯甲酸的结构类似物。(c) 叶酸是一种生长因子。

异烟肼

异烟肼（isoniazid）（图 26.9）是一种重要的生长因子类似物，但是它的用途比较窄（图 20.15）。异烟肼只针对结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）有效，因为它能够影响分枝菌酸的合成，而分枝菌酸是结核菌细胞壁的重要成分。异烟肼是烟酰胺（一种维生素）的类似物，也是目前最有效的控制和治疗结核病的药物（图 20.15，见 26.5 节）。

核酸类似物

图 20.18 列出了一些例子，这些核酸类似物是通过在正常的碱基中加入氟原子或溴原子而形成的。氟原子相对较小，它的加入不会改变碱基的整体构型，但却会使碱基的化学性质产生改变从而无法在细胞代谢中发挥正常功能。5-氟尿嘧啶与组成核酸的碱基尿嘧啶类似，5-溴尿嘧啶则与胸腺嘧啶类似。核酸类生长因子类似物不但可用作病毒感染和真菌感染的治疗，还常常被作为诱变剂使用（见 20.10 节、20.11 节和 10.4 节）。

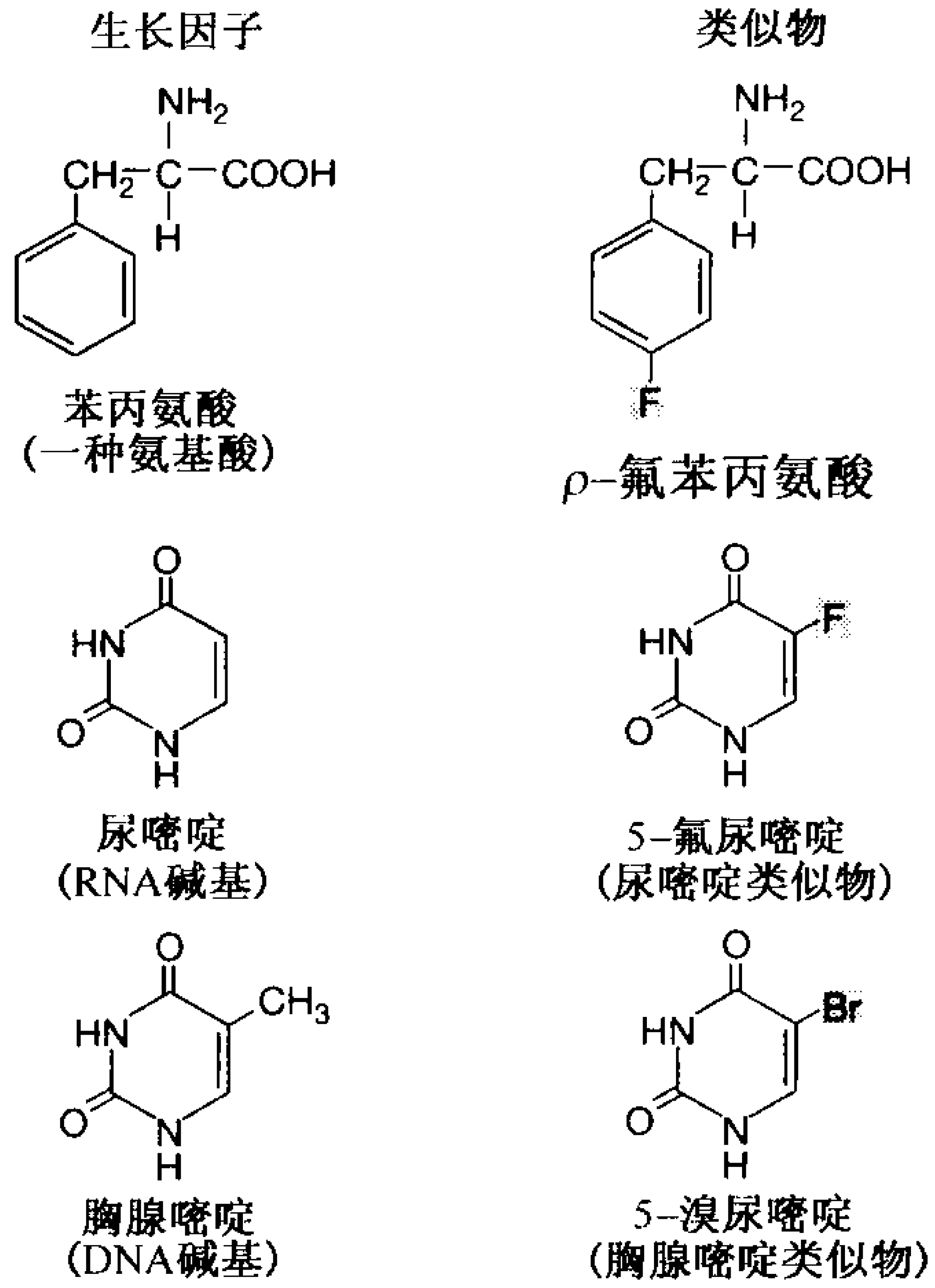


图 20.18 生长因子与结构类似物的比较。生长因子见 5.1 节和表 5.3。

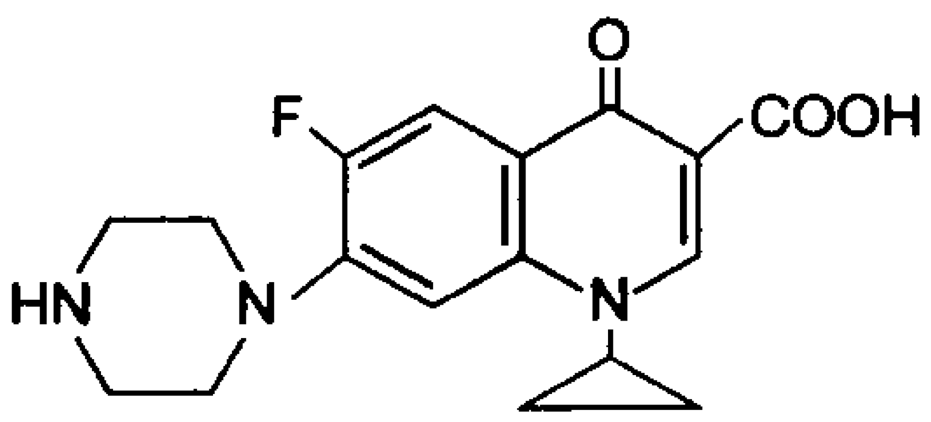


图 20.19 环丙沙星，一种喹诺酮类抗生素。环丙沙星是由萘啶酮酸（图 20.13）衍生的一种氟化物。它的溶解性要好于萘啶酮酸，在临床治疗过程中能够更好地融入血液和细胞组织。环丙沙星常被用于治疗尿道感染和炭疽病，后者是由对青霉素抗性的炭疽芽孢杆菌引起的。

喹诺酮

喹诺酮（quinolone）是合成类抗菌化合物中的一个单独分支，它可以与细菌的 DNA 回转酶（又称促旋酶）相互作用，阻碍细菌 DNA 超螺旋的形成，进而影响细菌细胞中的 DNA 包装过程（见 7.3 节）。萘啶酮酸是喹诺酮的原型（图 20.13 和图 20.14）。氟喹诺酮类药物（如环丙沙星）（图 20.19），是由萘啶酮酸衍生而来的。除了常被用于治疗人类尿道感染外，环丙沙星还常被用于治疗由炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）所引起的感染，该菌对青霉素有抗性，能够引起炭疽疾病（见 25.13 节）。在所有细菌中都有 DNA 旋转酶的存在，所以氟喹诺酮类药物对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌引起的感染均有显著的疗效（图 20.15）。此外，氟喹诺酮药物还广泛用于畜牧业及家禽饲养业，用以防止牲畜及禽类的呼吸系统疾病。

概念检查

合成类抗微生物制剂对细菌、病毒及真菌具有选择性毒力。磺胺类药物、异烟肼和核酸类似物等生长因子类似物均是人工合成的代谢抑制物。而喹诺酮类药物则可以抑制细菌中 DNA 促旋酶的作用。

- ◆ 什么是选择毒力?
- ◆ 合成类化疗剂和防腐剂、消毒剂之间有何区别?
- ◆ 描述任一种生长因子类似物的作用机制。

20.7 自然产生的抗微生物药物：抗生素

与合成类抗微生物化合物相比，抗生素（antibiotic）属天然药物。许多真菌和细菌都可以产生抑制或杀死其他微生物的化学物质，这些化学物质就是抗生素。在已发现的大量抗生素中真正有医药价值的仅占 1%。这些抗生素对治疗传染病起了很大的作用。某些天然的抗生素经化学修饰后更有效，这类经过化学修饰的抗生素称半合成抗生素（semisynthetic antibiotic）。抗生素的大规模工业生产将在第 30 章中讨论。

抗生素和选择性的抗微生物毒力

不同微生物对抗生素及其他化疗剂的敏感性不同（图 20.15）。例如，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌对某种特定抗生素的敏感性就很可能不同（但某些广谱抗生素能够同时作用于这两类细菌）。总的来说，广谱抗生素（broad spectrum antibiotic）的应用范围要比窄谱抗生素（narrow-spectrum antibiotic）更广泛。窄谱抗生素的价值在于可以用来控制对其他抗生素不敏感的微生物。万古霉素（vancomycin）就是一个很好的例子，它是一种窄谱的糖肽类抗生物，对那些具有青霉素抗性的细菌，如葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）及梭菌属（*Clostridium*）（图 20.13，图 20.14 和图 20.15）均有很好的杀灭作用。

在细菌中，抗生素的主要作用目标是核糖体（与蛋白质翻译相关）、细胞壁、细胞膜以及 DNA 的复制和转录系统（图 20.14）。下面我们将主要讨论抗生素对蛋白质合成及转录过程的抑制机制。

影响蛋白质合成的抗生素

许多抗生素通过与核糖体的相互作用来抑制蛋白质的合成（图 20.14）。这些相互作用均有很高的特异性并且与 rRNA（图 20.14）密切相关。这类抗生素中，有一些被用于疾病治疗，还有一些成为科学研究的有力工具，因为它们能够阻断蛋白合成过程中的某些步骤（见 7.16 节）。例如，链霉素能够抑制蛋白质链合成的启动（initiation），而嘌呤霉素、氯霉素、放线菌酮和四环素则能够抑制蛋白质链的延伸。

即使两种抗生素抑制的均是蛋白质合成过程中的同一个步骤，它们的作用机制也很有可能是不同的。举例来说，链霉素结合于核糖体的 A 位点，当多肽链延伸时，链霉素取代了氨酰基-转运 RNA 复合体的位置（图 7.37 和图 7.38），从而形成了链霉素-多肽复合体。随后，该复合体从核糖体上释放，从而中断多肽链的延伸。而氯霉素则是通过阻碍肽键的形成来抑制多肽链的延伸的。

许多抗生素只能特异地抑制 1～2 个种系微生物的核糖体。例如，氯霉素和链霉素特异性地针对细菌核糖体，而放线菌酮只影响真核生物核糖体。由于线粒体和叶绿体也具有原核类型的核糖体，所以那些能够抑制细菌蛋白质合成的抗生素也能够抑制蛋白质

在这些细胞器中的合成（见 14.4 节）。这类抗生素（如四环素），在医疗方面有很重要的作用，因为在以抗微生物为目的的治疗中，其药物浓度是无法影响真核线粒体的。

影响转录过程的抗生素

许多抗生素通过特异性地抑制 RNA 合成来影响转录过程（见 7.10 节和图 20.14）。例如，利福平和曲张链丝菌素（streptovaricin）能够与 RNA 聚合酶的 β 亚基结合从而抑制 RNA 的合成。这些抗生素对细菌、线粒体和叶绿体有特异性。放线菌素通过与模版 DNA 的结合阻断 RNA 的延伸，其与 DNA 链中的鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对结合力最强，当 RNA 合成时，它可以插入到双链 DNA 的“大沟”中阻挡 RNA 链的延伸。

另外一些非常有用的抗生素是直接针对细菌的某些独特结构（如细胞壁）起作用的。我们将在下一节中讨论这类抗生素。

概念检查

抗生素是由各种微生物产生的一类抗微生物化合物。尽管已知的抗生素有很多，但由于吸收效率和毒力等方面的原因，其中绝大部分并不能用于人或动物的治疗。许多抗生素是通过抑制目标微生物的转录或翻译过程来发挥作用的。

◆ 抗生素和生长因子类似物有何区别?

◆ 什么是广谱抗生素?

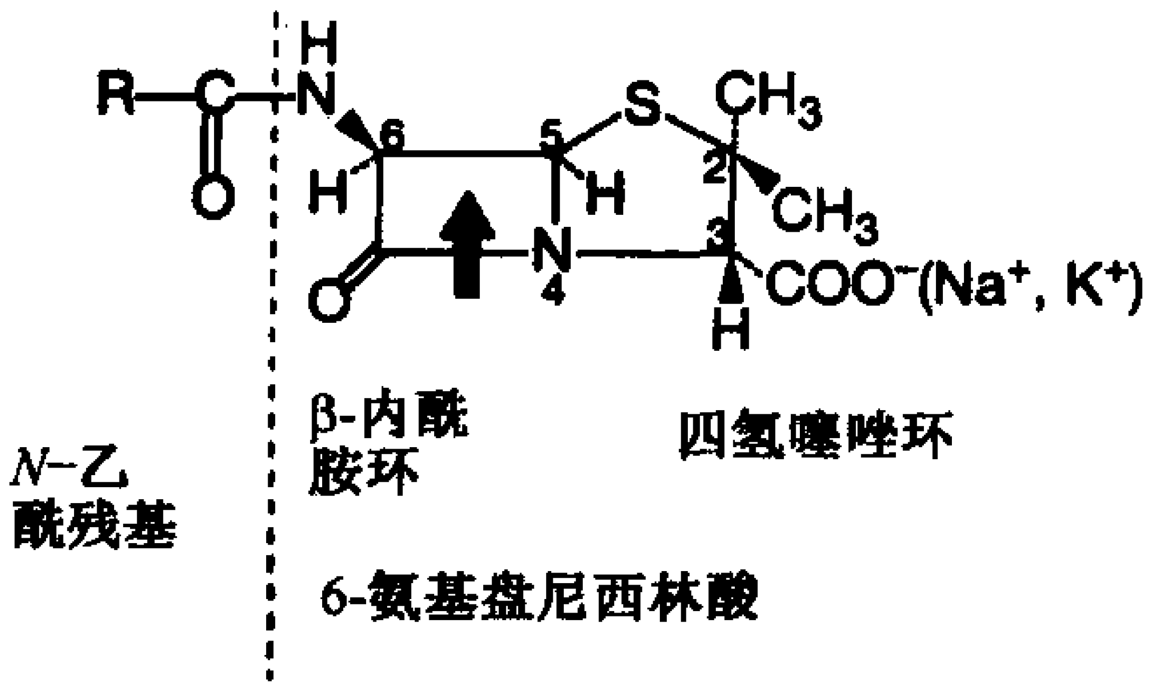
◆ 请指出在抑制蛋白质合成和转录的过程中，有哪些位点可以作为抗生素的潜在作用位点。

20.8 β-内酰胺类抗生素：青霉素和头孢菌素

β-内酰胺类抗生素（β-lactam antibiotic）是一类在历史上和医药上都十分重要的抗生素。它包括青霉素（penicillin）、头孢菌素（cephalosporin）和头孢霉素（cephamycin），均为重要的医用抗生素。这类抗生素含有 β-内酰胺环（图 20.20），因而称为 β-内酰胺类抗生素，其中青霉素和头孢菌素的产量占到了抗生素生产总量的一半以上，并在世界范围内广泛使用（图 20.16）。

青霉素

1929 年，英国科学家亚历山大·弗莱明（Alexander Fleming）从产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）中鉴定出一种抗细菌产物，将其命名为青霉素 G（penicillin G，图 20.20）。青霉素 G 是最早被发现的 β-内酰胺类抗生素，也是最早用于临床的抗生素。20 世纪 30 年代，尽管磺胺类药物已经被大量使用，但仍有大量的感染疾病不能得到有效控制。但在 1939 年，由于第二次世界大战的暴发，为了控制大量伤员的伤口感染，霍华德·弗洛里（Howard Florey）和他的助手们发明了大规模制备青霉素的方法。这种新型抗生素能非常有效地控制军队中由葡萄球菌和肺炎球菌所引起的感染，并且能够比磺胺更有效地治疗链球菌感染。到 1945 年第二次世界大战结束的时候，青霉素已经



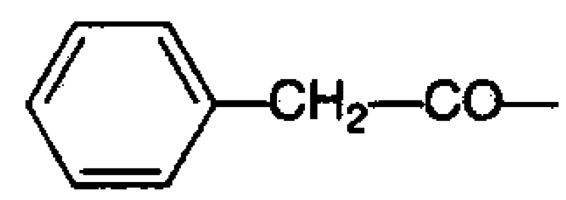
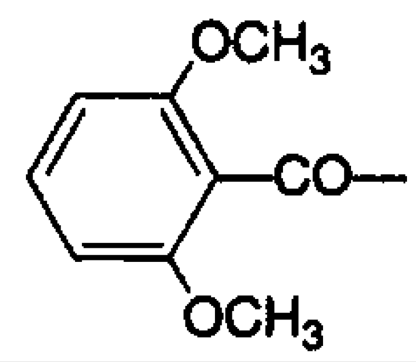
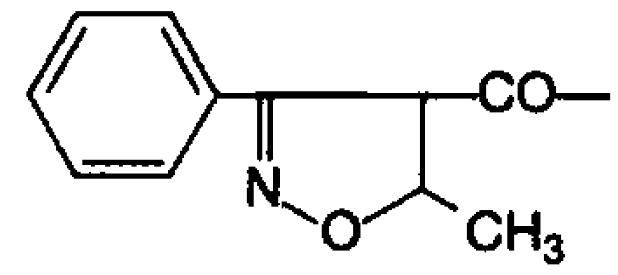
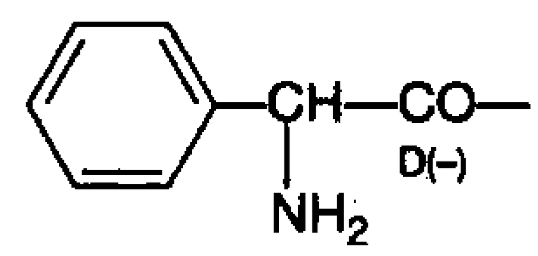
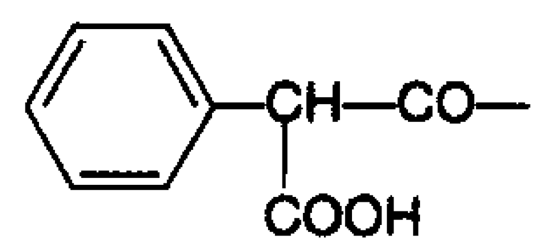
设计	N-乙酰残基
天然青霉素 苄青霉素 （青霉素G） G⁺菌活性 β-内酰胺酶敏感	
半合成青霉素 二甲氧基苯青霉素 酸稳定 β-内酰胺酶抗性	
噁西林 酸稳定 β-内酰胺酶抗性	
氨苄青霉素 广谱活性 （尤其对G⁻菌） 酸稳定 β-内酰胺酶抗性	
羧苄青霉素 广谱活性 （尤其对铜绿假单胞菌）酸稳定， 但口腔失活 β-内酰胺酶敏感	

图 20.20　青霉素。红色箭头为多数 β-内酰胺酶的作用位点。

被广泛使用，同时制药公司也开始寻找新的抗生素，这直接导致了许多新药的发现，并使感染疾病的治疗发生了革命性地转变。

青霉素 G 主要对革兰氏阳性菌起作用，因为它不能渗透进革兰氏阴性菌中。目前，许多半合成青霉素（semisynthetic penicillin）都能够有效作用于革兰氏阴性菌。图 20.20 展示了一些青霉素的结构。改变青霉素 G 的结构能够显著影响这种抗生素的性质。例如，半合成的氨苄青霉素和羧苄青霉素便能够有效控制革兰氏阴性菌。*N*-已酰残基结构的改变，使得这些半合成青霉素能够进入革兰氏阴性菌的细胞外膜（见 4.9 节），从而抑制细胞壁的合成。需要注意的是，青霉素 G 对 β-内酰胺酶敏感，这种酶是由青霉素抗性菌所产生的（见 20.12 节）。而半合成的苯唑青霉素和二甲氧基苯青霉素却对 β-内酰胺酶不敏感，能够对青霉素抗性菌起作用。

作用机制

β-内酰胺类抗生素是细胞壁合成的强烈抑制剂。转肽反应是细胞壁合成的重要特征，它能阻止与糖链相连的短肽间的交联（图 6.5）。青霉素和其他 β-内酰胺类抗生素能与转肽酶结合，使其丧失催化转肽反应的活性，因此转肽酶又称青霉素结合蛋白质（penicillin binding protein，PBP）。此时，细胞壁虽然能继续合成，但由于转肽酶无法再催化转肽反应，使得新合成的细胞壁无法形成交联而导致肽聚糖骨架断裂。此外，抗生素-PBP 复合物还能够促进自溶素的释放，而后者能消化已有的细胞壁。因此这类抗生素能削弱细胞壁，最终使细胞壁降解，由于细胞内外渗透压不同，最终导致细胞裂

解。而万古霉素（图 20.13）是肽链的类似物，它不与 PBP 结合而是直接作用于肽聚糖前体物中的末端（见 6.3 节和图 6.5）来阻止转肽反应。

由于细菌细胞壁的合成机制是细菌所特有的，所以 β-内酰胺类抗生素是高度特异性的，对宿主细胞无害。但由于这类抗生素结构复杂，某些特殊人群会对某些 β-内酰胺类化合物产生过敏反应（见 22.15 节）。

头孢菌素

头孢菌素是另一类含有 β-内酰胺环的药用抗生素。它是由一种称为头孢霉（*Cephalosporium* sp.）的真菌所产生的（见 30.6 节）。与青霉素的结构不同的是，头孢菌素含有六元二氢噻唑环而非五元噻唑环。但这两种抗生素的作用方式仍然相同，即通过与 PBP 结合来阻止肽聚糖交联。头孢菌素比青霉素的抗菌谱宽且对于破坏 β-内酰胺环的酶（β-内酰胺酶）有更强的抵抗力。头孢曲松（图 20.13）是一种常见的头孢菌素，有很强的 β-内酰胺酶抗性，已代替青霉素来治疗由淋病奈瑟球菌（*Neisseria gonorrhoeae*，见 20.12 节和 26.12 节）引起的传染病，因为许多淋病奈瑟球菌的菌株都有产生 β-内酰胺酶的能力而呈现出青霉素抗性。

概念检查

β-内酰胺类抗生素是很重要的一类药用抗生素。它包括青霉素和头孢菌素这两大类。这类抗生素能特异性地影响细菌细胞壁的合成，并且具有较低的宿主毒性和广泛的抗菌谱。

◆ 画出 β-内酰胺环的结构并标出 β-内酰胺酶的作用位点。

◆ β-内酰胺类抗生素是如何发挥作用的?

◆ 在治疗由革兰氏阴性细菌所引起的感染时，头孢菌素相比青霉素有何优势?

20.9 原核生物产生的抗生素

许多作用于原核生物的抗生素也是由原核生物产生的，其中包括氨基糖苷类（aminoglycoside）、大环内酯类（macrolide）和四环素类（tetracycline）。这些抗生素都有重要的医用价值，此处我们只讨论它们的一般性质。

氨基糖苷类抗生素

氨基糖苷类（aminoglycoside）抗生素含有由糖苷键连接起来的氨基糖（见 3.3 节）。一些药用抗生素属于这一类，其中有链霉素（streptomycin，由灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* 产生）及其衍生物（图 20.13）、卡那霉素（kanamycin，图 20.21）、新霉素（neomycin）、庆大霉素（gentamicin）、妥布霉素（tobramycin）、乙基西梭霉素（netilmicin）、大观霉素（sepctinomycin）和丁胺卡那霉素（amikacin）。这类抗生素能在核糖体 30S 亚基水平上抑制蛋白质合成（图 20.14），能够有效地作用于革兰氏阴性细菌（图 20.15）。

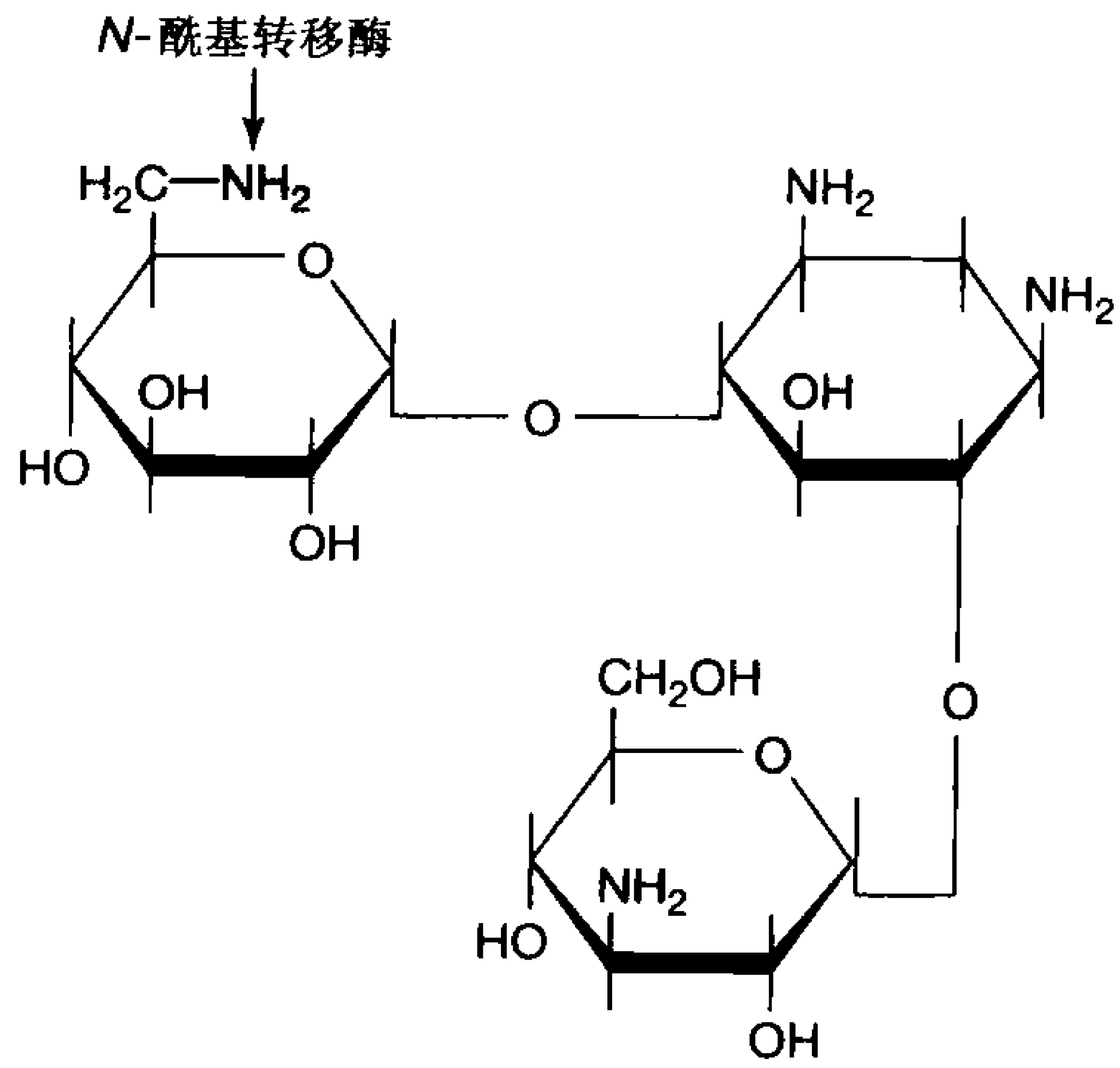


图 20.21　一种氨基糖类抗生素——卡那霉素的结构。其中氨基糖用黄色表示。箭头处为 *N*-酰基转移酶的作用位点，该酶由一种抗性质粒所编码。一旦被该酶乙酰化，抗生素将失去活性。

链霉素是最早能够有效治疗结核病的抗生素。然而，没有一种氨基糖苷类抗生素能在现代医学中得到广泛使用，它仅占到抗生素总产量和使用量的 3%左右（图 20.16）。因为在使用过程中会产生神经毒性和肾毒性等严重的副作用，链霉素已经被其他一些人工合成类抗微生物药物所取代。随着半合成青霉素和四环素的出现，用氨基糖苷类抗生素在治疗传染病过程中的使用也逐渐减少（见 20.8 节）。如今，氨基糖苷类抗生素作为一种保守性抗生素，只有在其他抗生素都无效的情况下才投入使用。

大环内酯类抗生素

大环内酯（macrolide）抗生素是一类含有与糖残基相连的、大的内酯环的抗生素（图 20.22）。大环内酯和糖残基的变化使大环内酯类抗生素呈现出多样性。最常见的大环内酯类抗生素是红霉素[erythromycin，由暗红产色链霉菌（*Streptomyces erythreus*）产生]，另外还有地红霉素（dirithromycin）、克拉霉素（clarithromycin）和阿奇霉素（azithromycin）。大环内酯类抗生素占世界抗生素产量及用量的 11%左右（图 20.16）。红霉素作为蛋白质合成抑制剂在核糖体 50S 亚基水平上起作用（图 20.14），在医疗上可代替青霉素用于对青霉素及其他 β-内酰胺类抗生素过敏的患者。另外，红霉素在治疗由军团菌属引起的疾病方面有特效（见 28.7 节）。

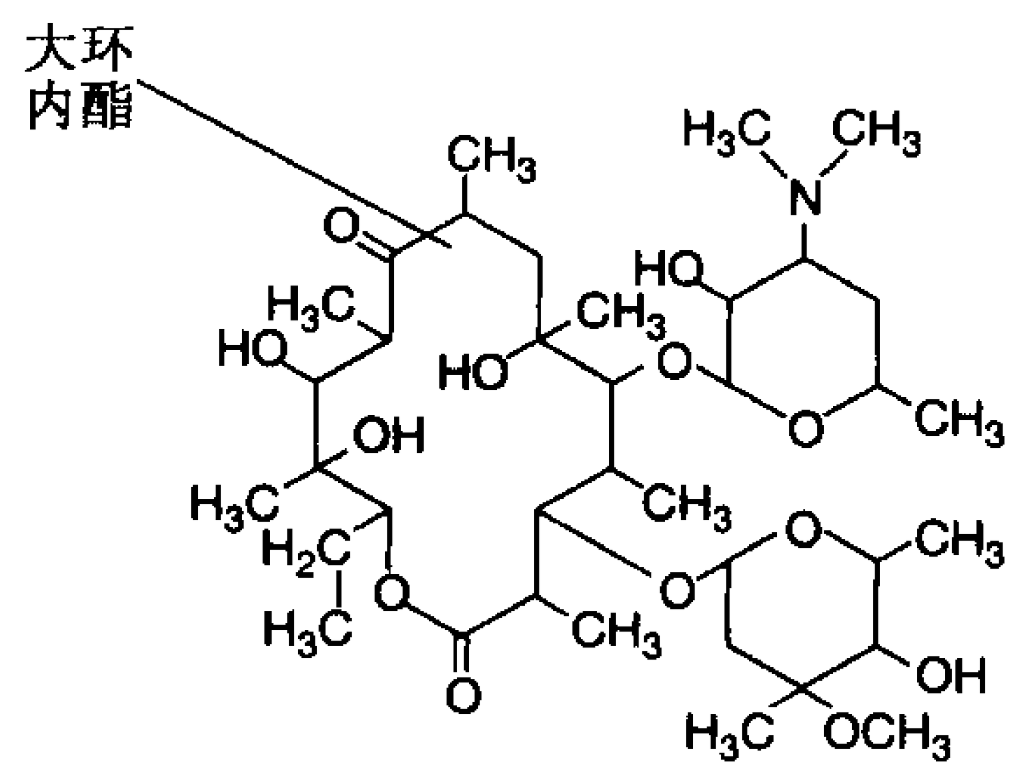
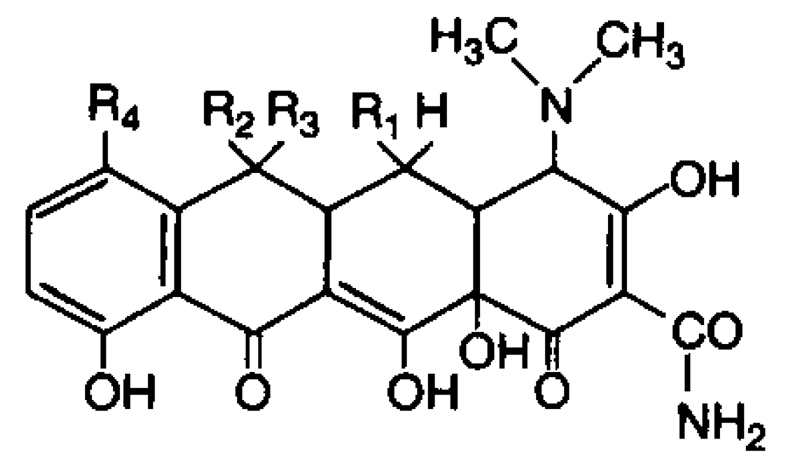


图 20.22　一种大环内酯类抗生素——红霉素的结构。红霉素是一种用途广泛的广谱抗生素。

四环素类抗生素

四环素类（tetracyclines）抗生素是由链霉菌属（*Streptomyces*）的一些细菌所产生的一类重要的抗生素，在医药中有着广泛的应用。它们属于最早的广谱抗生素，能抑

制几乎全部的阴性菌和革兰氏阳性菌。四环素的基本骨架是并四苯环（图 20.23），环上带有一些其他成分。例如，金霉素（chlortetracycline）中含有一个氯原子，土霉素（oxytetracycline）中含有一个附加的羟基（—OH）而没有氯原子。



四环素类似物	R_1	R_2	R_3	R_4
四环素	H	OH	CH_3	H
7-金霉素	H	OH	CH_3	Cl
5-土霉素	OH	OH	CH_3	H

图 20.23 四环素。半合成的四环素衍生物是一类重要的抗生素。

以上的 3 种抗生素均可由微生物产生，但同时市场上也有一些半合成的四环素，这类物质是用化学方法向并四苯环中加入其他组分形成的。与红霉素和氨基糖苷类抗生素相同，四环素也是一种蛋白质合成的抑制剂，它能干扰 30S 核糖体亚基的功能（图 20.14）。

四环素和 β-内酰胺类抗生素是两类在医药领域最重要的抗生素。四环素还可用作兽用药物，在一些国家中这类抗生素还被用作家禽和猪的食品营养添加剂。然而，这种药用抗生素的非医疗应用已逐渐被淘汰，因为它有引起抗生素抗性发展的潜在危险（见 20.12 节）。

达托霉素

达托霉素（daptomycin）也是由链霉菌属的一些细菌所产生。它是一种环脂肽类新型抗生素，有着独特的作用机制（图 20.14）。主要被用于治疗由革兰氏阳性菌（如葡萄球菌、链球菌等）所引起的感染疾病。达托霉素能够结合在细菌的细胞膜上并诱导膜电势的去极化反应。去极化后的细胞将失去合成大分子（如核酸、蛋白质等）的能力，最终死亡。由于其独特的膜结合机制，目前还没有在任何细菌中发现针对该种抗生素的显著的、可转移的抗性机制。

概念检查

氨基糖苷类，大环内酯类和四环素类抗生素均为结构复杂的物质，它们由一些原核生物产生并对其他一些原核生物有抑制活性。所有这些抗生素都是通过影响蛋白质合成来发挥作用，而达托霉素则是一种能引起细胞膜去极化的新型抗生素。

◆ 氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类和达托霉素的生物来源是什么？

◆ 上述 4 类抗生素引起细胞死亡的作用机制是什么？

Ⅳ 对病毒及真核病原体的控制

能够控制病毒及真核病原体（如真菌）生长的药物，常常也会影响到真核宿主细胞的功能，因此，很难找到具有选择毒力的此类药物。只有那些能够特异性地优先作用于病原体代谢途径或结构组分的化疗剂才可以使用。这样的药物数量非常有限，下面我们将讨论一下它们的作用模式。

20.10 抗病毒药物

由于具有选择毒力的抗菌剂的发现，在治疗细菌感染方面，已经取得了巨大的成功。然而在抗病毒制剂的研制方面却进展缓慢。与细菌不同，病毒的复制步骤及许多代谢功能都依赖于宿主细胞，因此很难找到一种药物，能在不影响宿主细胞的前提下抑制病毒的复制。但是，仍然有一些药剂，其对病毒的毒力要比对宿主细胞的毒力强，甚至有少数一些制剂能够特异性地作用于病毒。为了找到有效控制人类免疫缺陷病毒（HIV，艾滋病致病源）（见 26.14 节）的措施，人们做出了大量的努力，并已经在利用化学药物控制病毒方面取得了瞩目的成就。

化学抗病毒药剂

最成功的也是最常用的化学抗病毒药剂是核苷酸类似物（nucleoside analogs，表 20.5）。这类药物中最先被广泛接受的是叠氮胸苷（azidothymidine，AZT），它能够抑制 HIV 等反转录病毒（图 26.38）。叠氮胸苷是胸苷的双脱氧衍生物，但缺乏 3′-羟基。它通过抑制 DNA 中间体的合成（即反转录）来抑制反转录病毒的复制，现已被用于抑制 HIV 的复制。如表 20.5 所示，许多与 AZT 作用机制相同的核苷酸类似物都已开发为抑制 HIV 的药物。

表 20.5　化学抗病毒治疗剂

种类/药品	作用机制	作用病毒
融合抑制剂		
恩夫韦地（enfuvirtide）	阻止 HIV 与 T 淋巴细胞膜的融合	HIV[a]
干扰素		
干扰素 α	诱导细胞产生抑制病毒复制的蛋白质	广谱（具宿主特异性）
干扰素 β		
干扰素 γ		
神经氨酸苷酶抑制剂		
奥塞米韦（oseltamivir）	封闭流感病毒神经氨酸苷酶的活性位点	A 型和 B 型流感病毒
扎那米韦（zanamivir）		A 型和 B 型流感病毒
非核苷类反转录酶抑制剂（NNRTI）		
奈韦拉平（nevirapine）	反转录酶抑制剂	HIV

续表

种类/药品	作用机制	作用病毒
核苷类似物		
阿昔洛韦（无环鸟嘌呤，acyclovir）	病毒聚合酶抑制剂	疱疹病毒、带状疱疹病毒
更昔洛韦（ganciclovir）		巨细胞病毒
三氟尿苷（trifluridine）		疱疹病毒
万乃洛韦（valacyclovir）		疱疹病毒
阿糖腺苷（vidarabine）		疱疹病毒、痘病毒、乙肝病毒
阿巴卡韦（abacavir，[a]ABC）	反转录酶抑制剂	HIV
双脱氧胸苷（didanosine，ddI）		HIV
恩曲他滨（emtricitabine，FTC）		HIV
拉米夫定（lamivudine，3TC）		HIV、乙肝病毒
司他夫定（stavudine，d4T）		HIV
扎西他滨（zalcitabine，ddC）		HIV
叠氮胸苷（zidovudine，AZT）（图 26.38）		HIV
三氮唑核苷（ribavirin）	阻止病毒 RNA 的加帽	呼吸道合胞病毒、A 型和 B 型流感病毒、拉沙热病毒
核苷酸类似物		
西多福韦（cidofovir）	病毒聚合酶抑制剂	巨细胞病毒、疱疹病毒
泰诺福韦（tenofovir，TDF）	反转录酶抑制剂	HIV
蛋白酶抑制剂		
安瑞那韦（amprenavir）	病毒蛋白酶抑制剂	HIV
茚地那韦（indinavir，图 20.28）		HIV
洛匹那韦（lopinavir）		HIV
奈非那韦（nelfinavir）		HIV
沙奎那韦（saquinavir，图 20.28）		HIV
焦磷酸盐类似物		
磷甲酸（foscarnet）	病毒聚合酶抑制剂	疱疹病毒、HIV、乙型肝炎病毒
RNA 聚合酶抑制剂		
利福霉素（rifamycin）	RNA 聚合酶抑制剂	痘病毒
合成胺类		
金刚胺（amantadine）	阻止病毒脱壳过程	A 型流感病毒
金刚乙胺（rimantadine）		A 型流感病毒

a. 人类免疫缺陷病毒。

几乎所有的核苷酸类似物，或者核苷类反转录酶抑制剂（nucleoside reverse transcriptase inhibitor，NRTI）的作用机制都一样，都是通过核酸聚合酶来抑制病毒核酸链的延伸，核苷酸类似物西多福韦（cidofovir）也是通过同样的方式起作用的（表 20.5）。因为这些药物同样会影响正常细胞中的核酸复制功能，所以它们对宿主细胞也有一定程度的毒性；并且由于抗性病毒的出现，许多 NRTI 类药物已经逐渐失去抗病毒效力（见 26.14 节）。

还有一些抗病毒药剂是直接以反转录酶为目标的。奈韦拉平（nevirapine）是一种非核苷类反转录酶抑制剂（non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor，NNRTI），便是通过直接与反转录酶结合来抑制病毒核酸的反转录过程。磷甲酸（phosphonoformic acid）是无机焦磷酸盐的类似物，它可以抑制核苷间交联键的形成，从而抑制病毒核酸

的合成。和 NRTI 一样，NNRTI 也有一定的宿主毒性，因为它们同样会影响正常宿主细胞的核酸合成。

蛋白酶抑制剂（protease inhibitor，PI）是一类新型的抗病毒药物（表 20.5，见 20.28 节）。这类药物对 HIV 有特效，它们能够结合于 HIV 蛋白酶的活性位点，抑制病毒多肽链的形成以及病毒的成熟过程（见 26.15 节和 20.13 节）。

最后一类抗 HIV 药物是以恩夫韦地（enfuvirtide）为代表的融合抑制剂（fusion inhibitor），此种药物是一个人工合成的含有 36 个氨基酸残基的小肽，它能够与 HIV 的 gp41 膜蛋白结合（表 20.5 和 26.14 节），导致该蛋白质在 HIV 与 T 淋巴细胞膜的融合过程中无法发生必要的构象改变，最终阻止病毒与靶细胞的融合。

抗流感病毒药物

有两类药物能够有效控制流感病毒感染：一类是金刚烷衍生物——金刚烷胺（amantadine）和金刚乙胺（rimantadine），它们是人工合成的胺类化合物，能够影响 A 型流感病毒的离子转运蛋白，从而抑制病毒的脱壳过程及随后的复制；另一类是神经氨酸苷酶抑制剂——奥塞米韦（oseltamivir）和扎那米韦（zanamivir），它们能够封闭 A 型和 B 型流感病毒神经氨酸苷酶的活性位点，阻止病毒从被感染的细胞中释放。这两类药物均被用于流感的治疗和化学控制（见 26.8 节）。

干扰素

干扰素（interferon）是一类低分子质量蛋白质（17 000 MW），它们能够刺激正常细胞产生抗病毒蛋白质，从而阻止病毒复制。来自被感染细胞的干扰素会与未感染细胞上的受体发生相互作用，促进未感染细胞中抗病毒蛋白质的合成，这些蛋白质可以阻止病毒的进一步感染。干扰素本质是一种细胞因子（cytokine），它由不同细胞产生，有 3 种分子形式：IFN-α 由白细胞产生，IFN-β 由成纤维细胞产生，IFN-γ 则由免疫淋巴细胞产生（见 23.11 节）。这 3 类干扰素都是有效的病毒抑制剂。

对于病毒干扰的研究发现，一种病毒的感染会影响另一种病毒对同一细胞的感染，研究者们由此发现了引起这一现象的一些小蛋白质。这些小蛋白质随后被命名为干扰素。活的病毒、病毒核酸和辐射失活的病毒均可产生干扰素。低毒力的病毒能诱发细胞产生更多的干扰素，这是因为高毒力病毒在干扰素被产生之前就抑制了细胞蛋白质的合成。天然或人工合成的双链 RNA（dsRNA）也可以诱导干扰素的产生。双链 RNA 只作为复制型存在于一些被 RNA 病毒（如鼻病毒或称感冒病毒）感染的细胞中（见 16.10 节和 26.8 节），它可以作为动物细胞病毒感染的信号并刺激干扰素的产生。

干扰素具有宿主特异性而非病毒特异性，某一物种产生的干扰素只能识别同一物种细胞上的特异性受体。举例来说，由一种动物针对鼻病毒感染产生的干扰素可以抑制同种动物中流感病毒的复制，而对其他动物体内的任何病毒都不起作用。

干扰素还有望成为抗癌制剂。已经有一些重组干扰素制品获得了使用批准。但干扰素作为化疗剂还无法被广泛使用，这是因为要在未感染的宿主细胞内刺激抗病毒蛋白质的产生，要求在局部位置有很高浓度的干扰素存在。因此，这些干扰素制剂的疗效实际上取决于我们的“输送”能力，即如何更好地通过注射或气雾剂等手段将干扰素制剂输

送到病灶处。此外，在病毒感染之前给予宿主细胞适当的干扰素刺激信号（如病毒核酸、温和病毒甚至人工合成核酸等）也可以达到同样的目的。

概念检查

有效的抗病毒制剂必须是以病毒特有的酶或代谢过程作为目标的。医用抗病毒制剂包括核苷酸类似物，和其他一些能够抑制核酸聚合酶及病毒基因组复制的药物。蛋白酶抑制剂则能够影响病毒的成熟过程。宿主细胞还能够产生一种称为干扰素的抗病毒蛋白质，它可以阻止病毒的复制。

◆ 为什么有效的抗病毒化疗剂数量很少？为什么这些药剂不被用于治疗感冒等普通的病毒感染？

◆ 核苷酸类似物，蛋白酶抑制剂及干扰素分别抑制病毒成熟的哪些步骤？

20.11 抗真菌药物

同病毒一样，目前对真菌的控制仍是医学上一个难点。这是因为真菌属于真核生物，其细胞内部的许多机制与人类及其他高等动物相同，因此许多作用于真菌代谢途径的化疗剂同样会影响到宿主细胞的代谢途径，造成药物对高等动物的毒副作用，所以，许多抗真菌的药物也仅能用于身体表面的治疗。尽管如此，仍有一些药物对真菌有选择性毒力。这些药物以真菌特有的结构或代谢过程为目标，其重要性也随着真菌感染在免疫抑制性个体中的流行而逐渐突出（见 26.14 节和 27.8 节）。下面较详细地介绍几类有选择性毒力的高效抗真菌化学物质。

麦角甾烯醇抑制剂

两类主要的抗真菌化合物都是通过与麦角甾烯醇作用或抑制它的合成而起作用的。多数真菌中，麦角甾烯醇相当于高等真核生物细胞膜中的胆固醇（见 4.5 节）。多烯（polyene）属于第一类抗真菌剂，是由链霉菌属产生的抗生素。它通过与麦角甾烯醇结合破坏细胞膜，最终影响细胞膜通透性，导致细胞死亡（图 20.24）。第二大类抗真菌剂包括氮杂茂环类物质（azole）和丙烯胺（allylamine），这类物质能选择性抑制麦角甾烯醇的生物合成，具有广谱的抗真菌作用。经氮杂茂环类物质处理后的真菌不能产生正常的细胞膜，导致细胞膜破坏及其一些重要活性（如营养运输）的改变。丙烯胺也能抑制麦角甾烯醇的合成，但它不易被动物细胞和组织吸收利用而只能在局部发挥作用。

棘白菌素

棘白菌素（echinocandin）是一种新型抗真菌药物（表 20.6）。它们通过抑制 1,3 β-D 葡聚糖合成酶的活性来起作用，该酶能在真菌细胞壁中形成葡萄糖聚合体（图 20.24）。因为哺乳动物细胞中没有这种酶，所以棘白菌素的作用是特异性的，并且能够在很短时间内导致真菌细胞的死亡。这类药物常被用于治疗假丝酵母属（*Candida*）感染，对那些对其他药物具有抗性的真菌也有很好的活性（见 26.14 节和 27.8 节）。

表 20.6　抗真菌药剂

种类	作用目标	实例	用途
丙烯胺类	麦角甾烯醇的合成	特比萘芬（terbenafine）	口服，外用
芳香族类抗生素	有丝分裂抑制剂	灰黄霉素（griseofulvin）	口服
唑类	麦角甾烯醇的合成	克霉唑（clortrimazole）	外用
		氟康唑（fluconazole）	口服
		伊曲康唑（itraconazole）	口服
		酮康唑（ketoconazole）	口服
		咪康唑（miconazole）	外用
		posoconazole	医嘱
		拉夫康唑（ravuconazole）	医嘱
		伏立康唑（voriconazole）	口服
几丁质合成抑制剂	几丁质合成	尼可霉素 Z（nikkomycin Z）	医嘱
棘白菌素	细胞壁合成	卡泊芬净（caspofungin）	静脉注射
核酸类似物	DNA 合成	5-氟胞嘧啶（fluorocytosine）	口服
多烯类	麦角甾烯醇的合成	两性霉素（amphotericin B）	口服，静脉注射
		制霉菌素（nystatin）	口服，外用
多效霉素	几丁质合成	多效霉素 A	农用
		多效霉素 B	农用

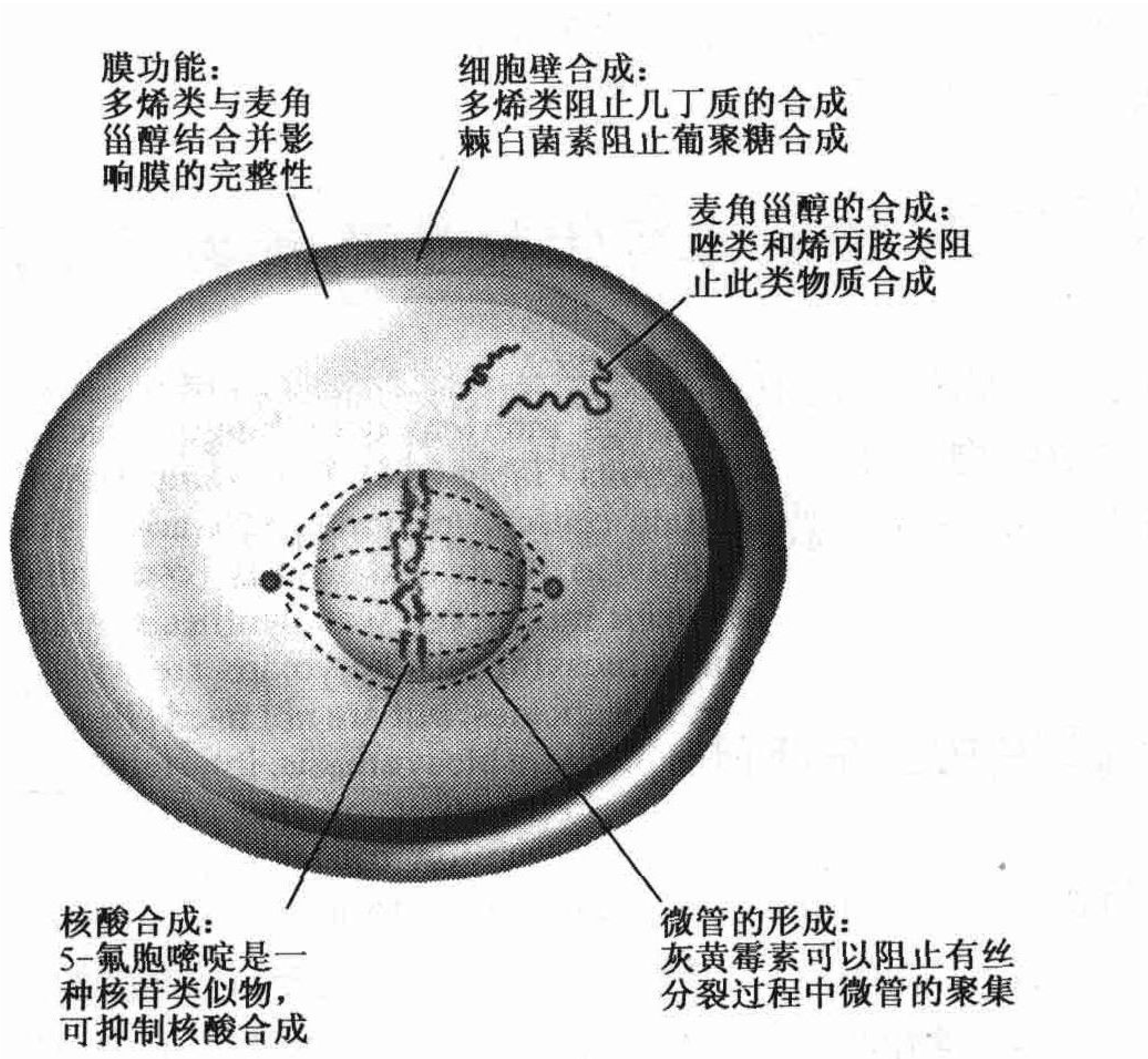


图 20.24　一些抗真菌化疗剂的作用位点。因为真菌属于真核生物，所以抗细菌类抗生素对它们不起作用。

其他抗真菌制剂

许多其他的抗真菌剂也能干扰真菌特有的结构和功能（表 20.6）。多数真菌中都含有一种 *N*-乙酰葡萄糖胺的多聚物——几丁质，这是一种仅在真菌和昆虫中存在的成分（表 17.9）。多氧菌素（polyoxins）可通过干扰几丁质的生物合成来抑制真菌细胞壁的合成。多氧菌素在农业真菌防治中广泛使用，但还没有被用于临床医疗。还有些药物能抑制叶酸的生物合成，干扰 DNA 复制过程中的拓扑结构，也有可能像灰黄霉素（griseofulvin）那样破坏有丝分裂中微管的聚集（见 14.7 节）。核酸的类似物 5-氟胞嘧啶（5-fluorocytosine）是一种有效的真菌核酸合成的抑制剂。其他的一些高效抗真菌剂还具有另外的生物学用途。例如，长春花新碱（vincristine）、长春灭瘟碱（vinblastin）和紫杉醇（toxol），这几类物质都是有效的抗真菌剂且具有抗癌特性。

遗憾的是，抗真菌药物的应用引发了抗性真菌和“新”的病原真菌的出现。假丝酵母属在正常条件下无致病性，但在用过抗真菌剂的个体中，这种菌会引起疾病，而且这种抗药的假丝酵母属病原体无法用目前已知的任何抗真菌药物来控制。

概念检查

抗真菌剂包含多种化学物质。因为真菌属于真核生物，所以很难获得对真菌具有选择性毒力的制剂，但目前我们仍然找到了少量有效的化疗剂。真菌感染的治疗是保证人类健康的重要组成部分。

- ◆ 医疗上为什么只存在极少量的抗真菌抗生素？
- ◆ 哪些因素使真菌感染呈现上升趋势？

V 抗微生物药物抗性及新药的发现

在处理病原微生物的过程中，特别是在医疗方面，抗微生物药物抗性是一个严重问题。这里将探索微生物菌体产生药物抗性的部分原因，并提出一些开发新型药物的策略。保持或增强现有药物疗效的部分方法我们将放在知识窗“预防抗生素抗性”中讨论。

20.12 抗微生物药物抗性

抗微生物药物抗性（antimicrobial drug resistance）指微生物获得的抵抗某种化疗剂作用的能力，而在正常情况下，微生物对这种治疗剂是敏感的。这种抗性与宿主无关，而是宿主中的微生物的一种相关功能。前面已经提到，抗生素是由微生物体所产生的，抗生素产生菌形成了一套能中和或破坏自身产生的抗生素的遗传机制，从而保证自身免受抗生素的破坏，而参与编码这一抗性机制的基因可以在相关生物体间传递。结果，通过基因交换，大部分抗性基因（resistance gene）便在各种微生物体间传播开来。

抗性机制

并非每种抗生素都能抑制所有的微生物，某些微生物对某些抗生素存在着天然抗性（naturally resistant）。微生物菌体具有天然抗生素抗性的可能原因有：① 微生物缺乏抗生素所抑制的结构。例如，支原体缺乏典型的细菌细胞壁，故具有对青霉素的抗性。②微生物对抗生素是非通透性的。例如，绝大多数革兰氏阴性菌对青霉素 G 都是非通透性的。③微生物可能会使抗生素变成非活性形式。许多葡萄球菌含有能将青霉素中的β-内酰胺环（图 20.25）切开的β-内酰胺酶。④有些微生物可能修饰抗生素的靶位点（target)。⑤某些微生物可以发展出新的具有抗性的生化途径。例如，许多病原菌形成了针对磺胺类药物的抗性（见 20.6 节和图 20.17)。磺胺类药物的作用机制是抑制细菌中叶酸的产生，而抗性菌通过改变自身的代谢机制，获得了从环境中直接摄取叶酸的能力，从而绕过了被磺胺类药物阻断的叶酸合成途径，具备了针对该类药物的抗性。⑥有机体可能会把进入细胞中的抗生素排出（外排，efflux)。表 20.7 中列出了一些具有抗生素抗性细菌的具体例子。

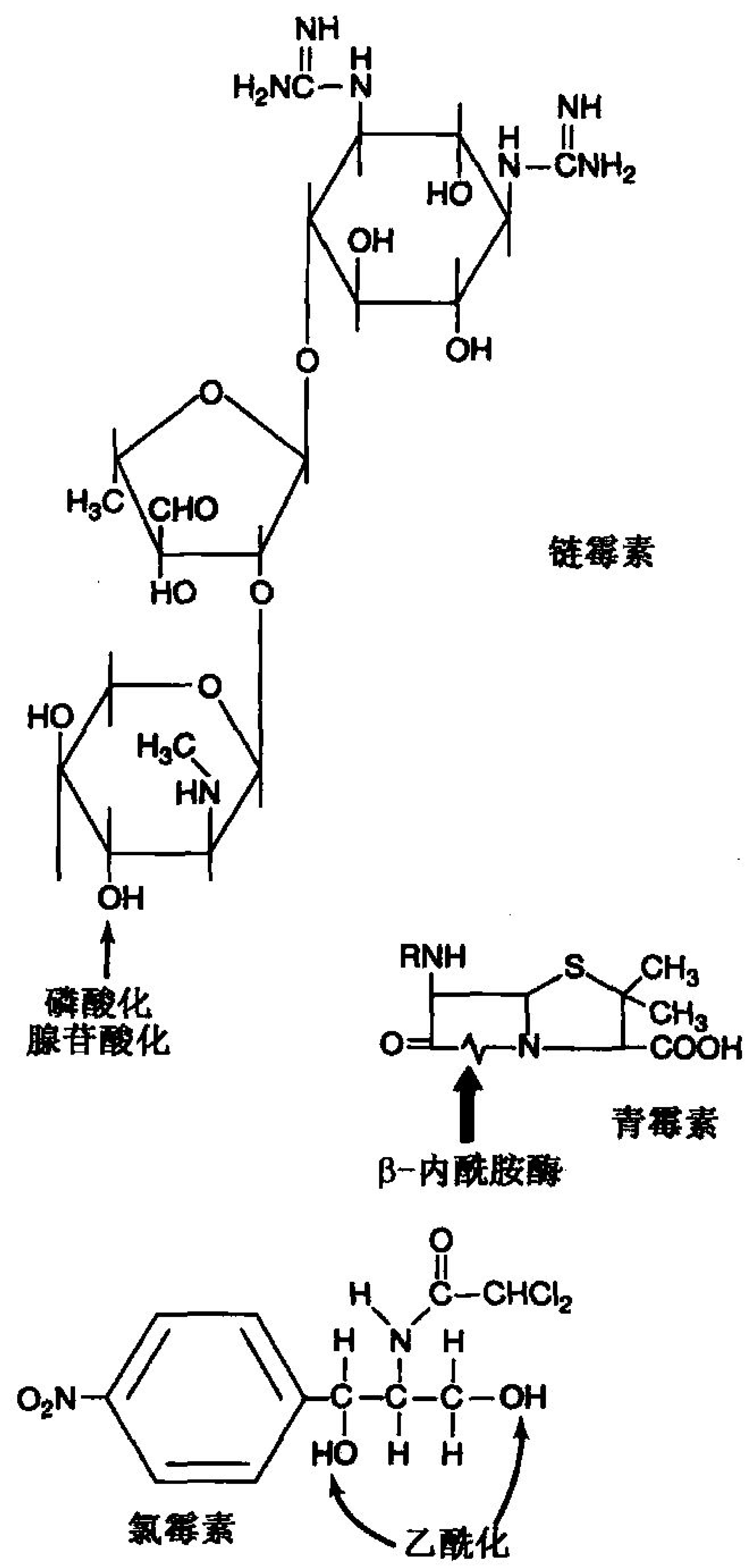


图 20.25　R 质粒基因编码的酶在抗生素上的作用位点。通过化学修饰或切割，抗生素可以被选择性地失活（图 20.20)。

表 20.7　细菌对抗生素抗性的机制

抗性机制	抗生素	抗性基因的基础	抗性微生物
渗透性降低	青霉素	染色体	绿脓杆菌 肠细菌
抗生素失活（如青霉素酶、甲基化修饰酶、乙基化酶、磷酸化酶和其他类型）	青霉素	质粒和染色体	金黄色葡萄球菌 肠细菌 淋病奈瑟球菌
	氯霉素	质粒和染色体	金黄色葡萄球菌 肠细菌
	氨基糖苷类抗生素	质粒	金黄色葡萄球菌
靶点变化（如 RNA 聚合酶，利福平；核糖体，红霉素和链霉素；DNA 解旋酶，喹诺酮）	红霉素 利福平 链霉素 诺氟沙星	染色体	金黄色葡萄球菌 肠细菌 肠细菌 肠细菌

续表

抗性机制	抗生素	抗性基因的基础	抗性微生物
形成抗性生化途径	磺胺类	染色体	肠细菌 金黄色葡萄球菌
外排（排出细胞）	四环素	质粒	肠细菌 金黄色葡萄球菌
	氯霉素	染色体	金黄色葡萄球菌 枯草芽孢杆菌
	红霉素	染色体	葡萄球菌属

正如 10.9 节和 10.10 节中讨论过的那样，抗生素抗性可以在染色体和质粒两种水平上编码，与这种抗性有关的质粒称为抗性质粒或 R 质粒（resistance plasmid，R factor）。典型的抗性都具有其特定的遗传机制（表 20.7）。由于抗生素抗性的不断发展，分离自临床材料中的细菌都必须用 MIC 方法或平板扩散法进行抗生素敏感性检测（见 20.4 节和图 20.10、图 20.11）。病灶分离物的抗生素敏感性检测的具体方法将在 24.3 节中详细介绍。

实验室中的抗生素抗性菌多数是从大量的敏感菌培养物中分离出来的，这种抗性往往是染色体突变的结果。多数情况下，由染色体基因编码的抗生素抗性会随作用靶位点的修饰而出现（如核糖体）。

由 R 质粒引起的抗性机制

从患者体内分离出的抗药性细菌中，其药物抗性基因较多的位于 R（resistance）质粒上（见 10.10 节）。R 质粒的抗性依赖于 R 质粒基因编码产生的多种新酶，这些酶可以使抗生素失活（inactivate，图 20.25），也可以阻止抗生素的吸收或将抗生素排出。氨基糖苷类抗生素具有由氨基糖单位构成的相似的化学结构，包括链霉素、新霉素、卡那霉素和壮观霉素。带有 R 质粒的抗性菌株中含有能修饰上述抗生素的酶，可将抗生素磷酸化、乙酰化或腺苷酰化从而导致其失活。

对于抗青霉素的 R 质粒来说，其作用机制是能够编码青霉素酶（β-内酰胺酶），这种酶能将 β-内酰胺环断开，因而破坏了药物的分子结构。R 质粒产生的氯霉素抗性是由于它能合成一种乙酰化酶作用于抗生素。R 质粒含有编码多种不同抗生素失活酶的基因，因此可使细胞产生多种抗性（见 10.10 节）。

抗性质粒的来源

人们虽然尚未得到有关多重抗性 R 质粒起源的直接证据，但已有许多间接证据表明，R 质粒出现早于抗生素的出现。一株在 1946 年冷冻干燥保存的大肠杆菌已经带有了编码四环素和链霉素抗性的质粒，尽管这两类抗生素在几年以后才用于临床。同样的，带有编码半合成青霉素抗性的 R 质粒的菌株也被证明，早在这种青霉素被人工合成之前就已经存在。

一些非致病性的革兰氏阴性土壤菌中也存在编码抗生素抗性的 R 质粒，这一现象可能具有重大的生态学意义。由于土壤中存在着一些抗生素产生菌（链霉菌

Streptomyces、青霉菌 *Penicillium*)，上述抗性菌就具有选择优势。由此看来，R 质粒早在抗生素发现和用于医疗或农业之前就已经存在于自然界中的微生物体内。

抗微生物药物抗性的传播

抗生素在医疗、畜牧业及农业中的广泛使用，为含有抗性基因的 R 质粒的传播提供了条件，并使得含有这些 R 质粒的细菌获得了选择优势。基于 R 质粒或其他因素的抗生素抗性的出现是自然选择的必然结果，它为抗生素作为化疗剂的长期使用造成了很大的限制。

抗微生物药物的过度使用加速了致病微生物中特定药物抗性的产生。抗生素的发现及其临床应用本身就伴随着抗性细菌的出现。图 20.26a 列出了抗生素的使用量及其抗性微生物的百分比。

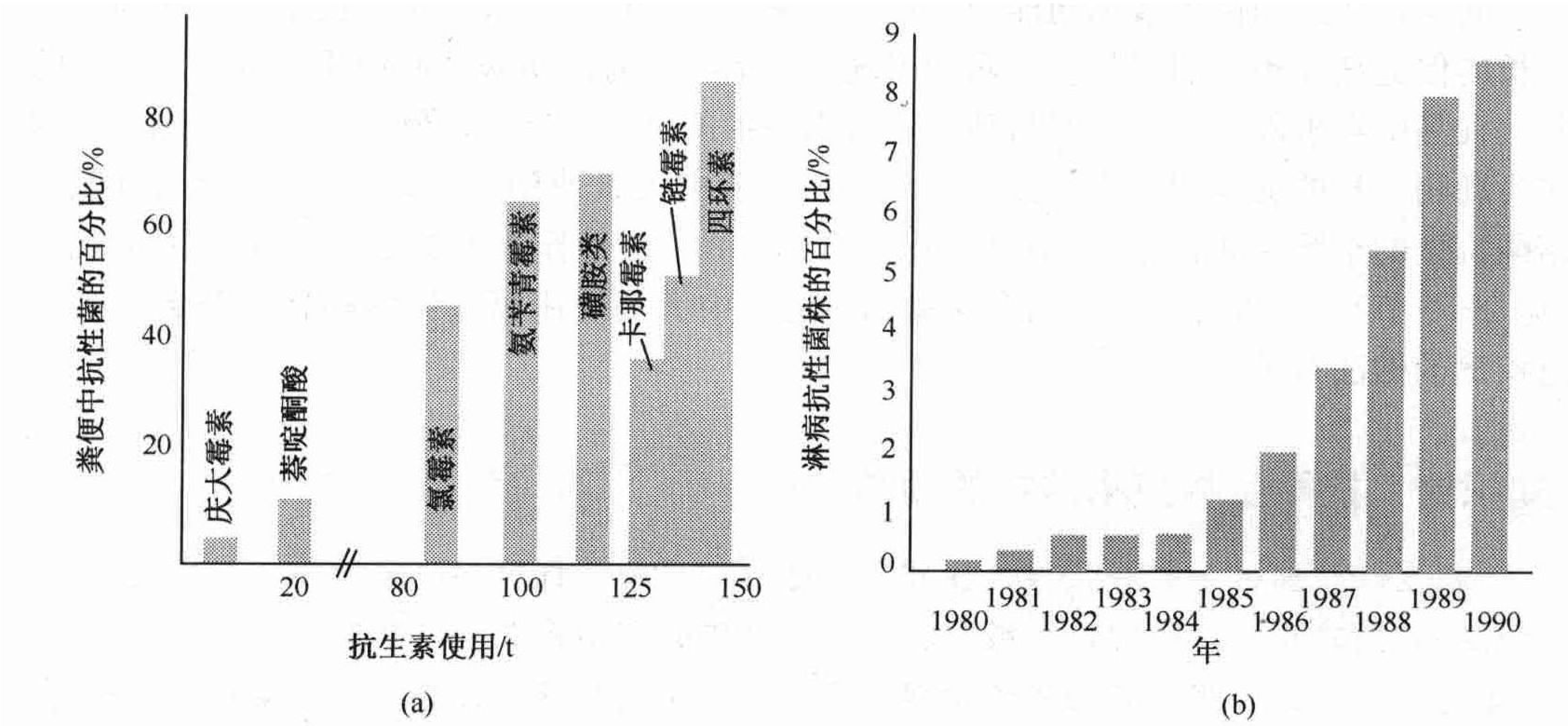


图 20.26　抗微生物药物抗性细菌的出现。(a) 抗生素的使用与分离自腹泻患者的细菌抗性株的比率。使用量最多的抗生素（用产量表示），出现抗性菌的比例也最多。(b) 由抗性菌株造成的淋病发生百分率。1985 年报道的抗生素抗性病例是 9000 例，到 1990 年增至 59 000 例，其中 95%的抗性病例是由产青霉素酶的淋病奈瑟氏球菌所引起的。由于药物抗性的产生，从 1990 年开始，青霉素已经不再推荐用于淋病的治疗。（资料来源：亚特兰大疾病控制与防治中心）

致病微生物抗性的产生使得以前被用于治疗某种特定感染的抗微生物制剂必须被更换或改变。历史上有许多由于抗生素的过度使用而导致抗性产生的例子，其中最经典的便是淋病奈瑟氏球菌（一种导致淋病的细菌）对青霉素抗性的发展（图 20.26b）。从 20 世纪 40 年代被发现以来，青霉素一直作为有效的淋病治疗药物而使用，而现在，青霉素却无法再成为治疗淋病的抗生素，因为大量临床中分离得到的淋病奈瑟氏球菌已经能够产生 β-内酰胺酶，即具有针对青霉素的抗性。实际上，抗性菌株自 1980 年便已经发展起来了。目前用于治疗淋病的药物是头孢曲松，但为了限制迅速出现的抗性的影响（见 26.12 节），人们几乎每年更换治疗方法。

世界范围内大量的调查结果表明，抗生素在治疗中的实际使用量远远超过了必需

量。数据显示仅有20%的感染疾病患者需要使用抗生素治疗。与此同时，抗生素处方的开出量却达到了80%。并且在高达50%的个案中，推荐剂量和持续服药时间都是不正确的。这其中也有一些不服从医嘱的病患者存在，许多患者在他们自己感觉“好多了”的情况下就擅自停止服药（特别是抗生素），这也会促进抗性菌的出现。例如，携带异烟肼抗性的结核菌的出现，就是由于患者没有遵照医嘱持续服药6～9个月（见26.5节）。这种情况下，恶性病原体常常短时间处于亚致死剂量抗生素的选择压力之下，最终导致了大量抗性菌株的出现。

不过令人欣慰的是，最近的研究结果表明，在美国范围内，这种趋势正在发生改变。同10年前相比，医师们为儿童患者开出的抗生素剂量降低到了原来的1/3。这种适当减少抗生素用量的做法正在被大力推行，特别是在在读医师、医疗机构、甚至患者群体当中进行倡导（见知识窗“抗微生物药物抗性的预防”）。

同样，非医用抗生素也同样会导致抗性菌株的出现。在农业中，抗生素被作为动物生长的促进剂和预防剂（防止疾病的出现而非治疗已有的疾病）而使用。近年来暴发的几次食品中毒事件已经被证明与动物饲料中添加的抗生素有关。例如，氟喹诺酮类药物作为动物生长的促进剂和疾病预防剂已经在农业中大量使用了将近20年。但具有氟喹诺酮抗性的空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）却是作为人类食源性病原菌出现的（见29.9节），这很可能与人们在家禽饲养过程中大量使用氟喹诺酮药物预防禽类呼吸道疾病的做法有关。

知识窗：抗微生物药物抗性的预防

微生物抗药性是一种获得性抗性，它是由微生物体针对那些预防和治疗感染疾病的化合物所产生的。通常，抗微生物药物通过阻断那些存在于少数微生物体中的某条代谢途径来发挥作用，而微生物体则很快通过改变或获得某种基因而产生针对某种药物的抗性。例如，19世纪30年代（磺胺类）及40年代（青霉素类）所使用的抗微生物制剂，许多微生物体在19世纪50年代时便已表现出了针对这些制剂的抗性。

据美国佐治亚州亚特兰大市的疾病预防与控制中心（CDC）指出，抗性的传播很快将会影响到我们每一个人，不论他是医疗服务的提供者还是一名患者。在美国，每年有将近200万患者罹患医院获得性感染（nosocomial）。这种感染很难治疗，因为引起这类疾病的70%以上的微生物体都具有抗药性。而在重症监护病房中，超过10%的类似感染是由金黄色葡萄球菌所引起的。从文后的附图中可以看出，在将近13年的时间里，针对甲氧青霉素、苯唑青霉素等青霉素衍生物的抗性已经提高了2倍。因为金黄色葡萄球菌很可能对多种药物都具有抗性，所以抗甲氧/苯唑青霉素的金黄色葡萄球菌（MRSA）的出现，为我们在治疗药剂的选择上带来了很大困难。更为严重的是，在结核杆菌及微肠球菌中至少分别有一株菌株对目前使用的最新型的抗生素具有抗性；而某些病原体则已经无法用抗生素疗法来进行控制。

针对这种情况，CDC提出了12个建议步骤，用以预防抗微生物药物抗性的产生（http://www.cdc.gov/drugresistance/healthcare/ha/12steps_HA.htm）。

预防抗微生物药物抗性产生的12个措施

预防感染

1. **预防普通疾病。**时刻保持最新的免疫方法，特别是要及时披露各种疾病信息。接种必须的疫苗（见22.12节），这其中应该包括每年的流感疫苗。此外，对于那些经常处于人口密集环境中的人（如医护人员、学校中的学生及军队中的士兵等），脑膜炎疫苗及肺炎免疫措施也是必需的。
2. **如无必要，尽量避免使用输液管（如IV tube）和导管等肠外设备。**这些设备很有可能将感染物质带入人体。如果确实需要使用，那么在使用完后应尽快将这些设备移除。

有效地诊断和治疗感染

3. **捕获病原体。**如有可能，尽量从感染者患处分离病原体并进行鉴定。在鉴定结果出来之前，判断其最可能是何种病原体，并用针对该种病原体的药物进行治疗。根据鉴定结果有针对性地调整最终的治疗方案。观察治疗过程中的反应并做出必要地调整。最后完成整个疗程。
4. **咨询专家。**对于严重的感染，请遵循医疗工作者的建议，如果在治疗开始之后状况没有明显好转，迅速征询第二套治疗方案。

明智地使用抗微生物制剂

5. **进行微生物控制方面的实践。**掌握关于抗微生物药物的适用性及使用方法等方面的最新知识。确保针对病原体所提供的治疗是目前普遍推荐的方法。
6. **使用本地数据。**从当地的医疗机构处获得关于抗菌谱（抗生素敏感性）的概况，并加以分析，理解。
7. **治疗感染，避免污染。**为了从感染处获得病原体标本，必须使用适当的消毒技术。污染生物有可能存在于导管或输液管线中。确保所得到的培养物是来自感染位点。如有怀疑，应该从患处重新取样培养。
8. **治疗感染，避免侵染。**确保治疗的对象是病原体而不是其他并未引起疾病的微生物体。举例来说，来自正常皮肤和咽喉的培养物常常会含有葡萄球菌之类的潜在病原体，但它们往往并不是引起当前感染的病原菌。
9. **尽量少使用新型抗微生物制剂。**在其他药物仍然有效的情况，不推荐使用最新的广谱抗生素，尽管它们的确非常有效。这是因为，一种药物被使用得越多，微生物体对其产生抗性的机会就越大。例如，目前分离出的某些微肠球菌已经表现出对万古霉素的抗性，而后者是一种较新型的广谱抗生素。这种现象的出现应该归结为万古霉素类药物在治疗MRSA感染的过程中被滥用了。

及时停止不必要的抗微生物治疗

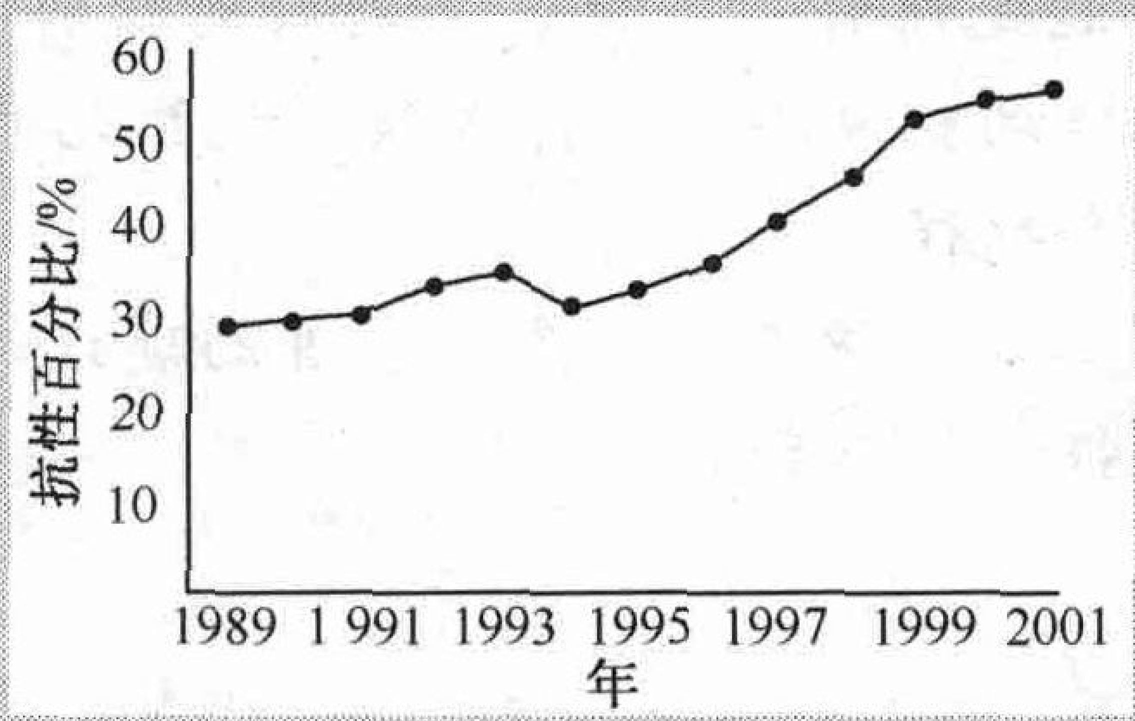
10. **对于已经确诊的感染，在疗程结束之后，应尽快停止抗微生物治疗。**而如果一种

感染无法被确诊，则应立即终止抗微生物治疗。以咽炎（咽喉痛）的治疗为例，在咽喉培养物确认之前，通常用针对化脓性链球菌感染的抗生素进行治疗。如果咽喉培养物被确认为化脓性链球菌阴性，则该抗生素治疗应立即停止。因为这种情况下，引起疾病的很可能是一种咽炎病毒，此时，抗生素治疗是无效的。

预防病原体转移

11. **隔离病原体。**确保感染人群周围的空间不被污染。对各种体液进行适当的清洁和处理。对织物、衣服等潜在污染源进行消毒。在医院中必须配备感染控制专家等相关人员。
12. **阻断接触传染链。**一旦染病，应避免在工作或学习场所接触其他人。患者和看护者都应注意保持自身清洁，特别要勤洗手。

以上这些措施就是关于理智地使用抗微生物药物的指导方针。这些措施可以延缓病原体抗性的产生并延长多数药物的有效周期。



1989～2001 年间，抗甲氧青霉素金黄色葡萄球菌在重症监护患者中所引起的医院获得性感染疾病。数据来自亚特兰大疾病防控中心的医院获得性感染监测系统。

抗生素抗性病原体

由于抗生素的滥用及缺乏有效的抗性监管机制，自 20 世纪 50 年代抗微生物化疗剂开始广泛使用至今，几乎所有的病原微生物都出现了针对某些抗生素的抗性（图 20.27）。青霉素和磺胺类药物是两类使用最早的化疗剂，由于许多病原菌都产生了对它们的抗性，这两类药物目前已不再广泛使用。即便是对青霉素特别敏感的微生物现在也需要比 10 年前大得多的剂量来治疗。例如，由生脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）引起的脓毒性咽喉炎、猩红热、风湿热等疾病的治疗（见 23.2 节）。

一些病原体已经发展出了针对所有已知抗微生物制剂的抗性（图 20.27）。这其中有一些是分离自具有甲氧苯青霉素抗性的金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）（见 26.9 节），有一些则来自具有万古霉素抗性的微肠球菌（vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*，VRE），还有一些则分离自节核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*，见 26.5 节）。并且越来越多不同来源的 MRSA 菌株对万古霉素的敏感性也在不断降低，这类菌株被称为“万古霉素中度耐药金黄色葡萄球

菌”（vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*，VISA 菌株）。

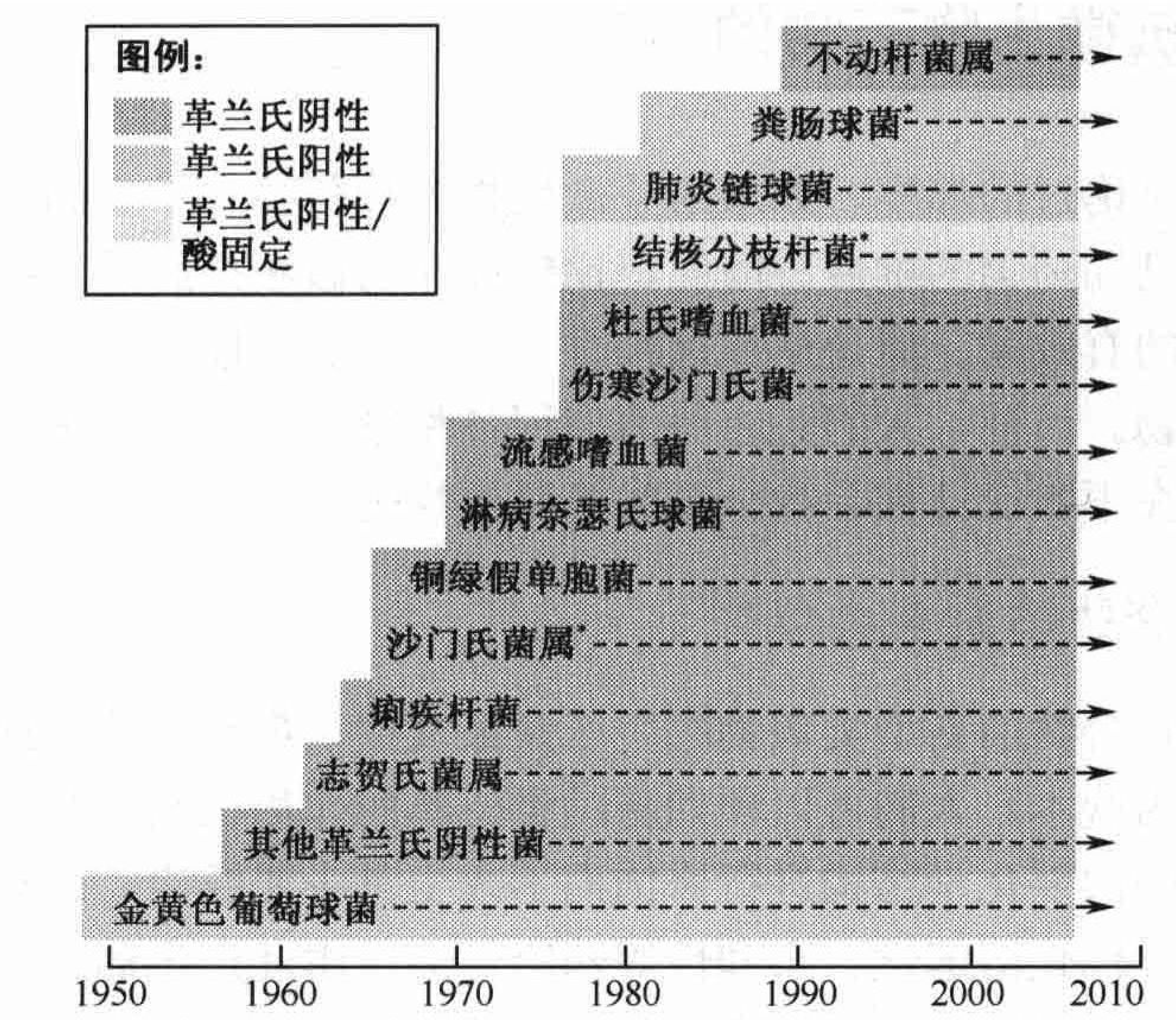


图 20.27　抗微生物药物抗性在一些人类病原体中的出现。星号所标记的菌株是一些利用目前已知的各种抗微生物药物均无法有效治疗的多重抗药性菌株。

如果各种药物只被用于治疗敏感菌株所引起的疾病，并且使用足够高的剂量作用足够长的时间，在微生物体有机会产生抗性之前将其有效抑制（或杀死），我们便能将抗生素抗性的发展控制在最低水平。将两种不相关的化疗剂混合使用也可以降低抗性，一种抗生素的抗性突变株很可能对另一种抗生素敏感。但含有多重抗药性的 R 质粒的传播将使得多种抗生素联合使用的方法逐渐失效。

不过目前有一些报告指出如果停止使用某种抗生素，针对这种抗生素的抗性将在几年之内逐渐消失。另一方面，抗生素抗性生物体可以在肠道内滞留一段时间。这一信息暗示我们，抗生素的效用可以通过长期的监控和谨慎地使用得以重新建立。接下来将要讨论的，人们正在利用各种方法不断寻找和设计新的药物生产化疗剂。

概念检查

抗微生物药物的使用促进了目标微生物中抗性的发展。抗性实际上是抗性基因选择的结果，并且这种选择可能被抗微生物药物的滥用所加速。目前有一些生物体已经发展出了针对所有已知抗微生物药物的多重抗性。

- ◆ 请指出细菌产生抗生素抗性的 6 种基本机制。
- ◆ 指出抗生素抗性基因的主要来源。
- ◆ 人们的哪些实践活动促进了抗生素抗性病原体的发展？

20.13 新型抗微生物药物的研究

正如我们已经讨论过的那样，如果给予微生物多种药物和一定的时间处理，最终有可能产生针对所有已知药物的抗性。因此，比较保守的做法是通过严格控制抗生素的使用来延长这些药物的有效期。但是从长远来看，要想解决抗性的产生，最好的办法是开发新的抗微生物药物。目前，人们正在努力应用各种策略和方法筛选及生产已有化合物的类似物，同时也在不断设计和寻找全新的抗微生物药物。

已有抗微生物化合物的新型类似物

已有抗微生物化合物的新型类似物的生产是最直接、最经济的措施。这是因为以原有的化合物的结构为蓝本，人们可以预期新的类似物的作用机制。在很多情况下，人们可以对已有化合物的次要化学结构进行修饰而不改变其主要结构，这样就能在保持原有药物活性的基础上，优化溶解性、亲和性等药物性能。由此产生的新的化合物将可能比原有药物更加有效。并且由于抗性的产生是基于药物结构的识别，这样一来，新的化合物将不会被微生物体中的抗性因子所识别。例如，图 20.23 所示的是四环素的基本结构和两个具有生物活性的衍生物。以四环素为“先导化合物”（lead compound，能够进行各种结构修饰的生物活性化合物），我们可以用一系列的化学替代物来修饰其中的 4 个 R 基团位点，从而可以产生近乎无限的各种四化素类似物。利用这一基本策略，用常规方法合成并测试了新型 β-内酰胺类抗生素（见 20.8 节）、新型四环素类化合物（见 20.9 节）以及新型万古霉素类似物（图 20.13），这其中的一些药物的杀菌能力甚至比原来提高了 100 倍以上。

化学学科中各种自动化方法的应用，极大地提高了发现并生产新型抗微生物药物的能力。这些自动化方法，被称为“组合化学”（combinatorial chemistry），即对一种已知的抗微生物产品进行一系列修饰从而产生出大量新的类似物。举例来说，以四环素（图 20.23）为先导化合物，运用组合化学的方法，向其结构中的 4 个 R 基团位点导入 5 种不同的物质，仅仅在几个小时之内，我们便能得到 625 种不同的四环素衍生物（4 个位点，5 种不同的替代物，可能产生的组合为 5×5×5×5 种）。这些化合物随后将被作用于各种不同的微生物，进行体外抗生素敏感性测定（见 20.4 节）。这些自动合成及筛选过程极大地缩短了新药发现的时间，并使得待测新药的数量以每年 10 倍的速度增长。

对药物产业的评估结果表明，必须筛选约 700 种候选化合物才能找到一种有效的临床药物。药物的效果在实验室中确认后还必须在动物实验中检测其药效和副作用，最后还必须经过临床的人体测试。动物测试包括一系列检测，常常要历时几年，以确保候选药物有效并且安全；而临床中每一种药物的人体测试同样也要花费几年时间。每年，制药工业需要投入 40 亿美元用于新的抗微生物药物的开发。一种新药从发现到应用于临床治疗大概要经过 10～25 年的时间。从实验室到临床测试，每一种新的被批准用于人体的抗生素的发现和开发要花费约 5 亿美元。

计算机辅助药物设计

全新的抗微生物药物的开发，要比已有药物的类似物的开发困难得多。这是因为要避免现有的抗性机制，新的抗微生物药物必须作用于代谢或生物合成途径的独特位点，或者具有与现存的化合物完全不同的结构。以往候选药物主要来自链霉菌或青霉菌等，然后通过一系列抗微生物活性的筛选，最后找到新的抗微生物化合物。但是，近年来随着计算机科学及结构绘图技术的发展，已经可以针对某些特异的微生物结构来设计能与之发生相互作用的药物。现在的药物开发是从计算机设计开始，新的药物在计算机虚拟的环境中被“创造”并进行“检测”，这种作法极大地降低了药物开发的成本（见 30.5 节和 26.8 节）。

近年来利用计算机辅助药物设计方法最为成功的例子就是沙奎那韦（saquinavir）

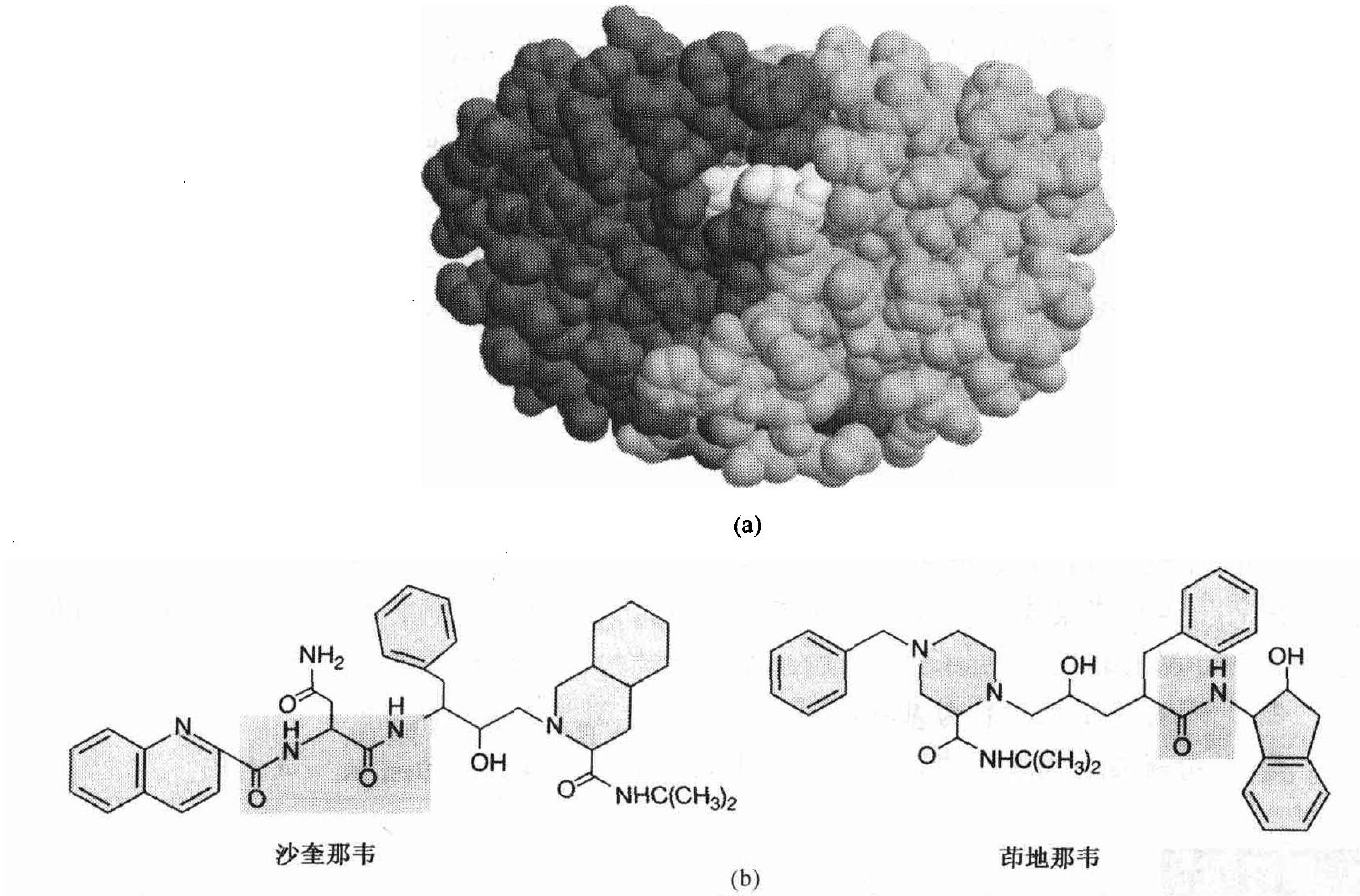


图 20.28　计算机设计的抗病毒药物。(a) HIV 蛋白酶同（源）二聚体。两条多肽链分别用绿色和蓝色表示。一个多肽（黄色）结合在催化位点上。HIV 前体蛋白的切割是病毒成熟的必须步骤（见 16.15 节和图 16.26）。利用所示底物多肽的类似物封闭蛋白酶的活性位点将可以抑制前体蛋白的加工及 HIV 的成熟。这一结构来自蛋白质数据库（Protein Data Bank）中的信息。(b) 这些抗 HIV 药物都是由计算机设计出来的多肽类似物，用以封闭 HIV 蛋白酶的活性位点。图中用橘黄色所标示的区域是多肽结合的相似区域。该类化合物被 HIV 蛋白酶结合后将阻止 HIV 前体蛋白的加工和病毒的成熟。这些化合物作为一类治疗药物被总称为蛋白酶抑制剂。这类化合物在感染细胞中的浓度配合它们与 HIV 蛋白酶的高亲和性，使得它们成为这些蛋白酶活性位点的高效竞争性抑制剂，能够有效阻止病毒的成熟过程。这些蛋白酶抑制剂已经被广泛用于 HIV 感染的治疗（见 26.14 节和表 20.5）。

的开发。这是一种蛋白酶抑制剂，可以减缓 HIV 在感染人群中的生长（图 20.28）。根据已知的酶-底物复合物的三维结构，人们利用计算机设计出了能与 HIV 蛋白酶的活性位点结合的抑制物，即沙奎那韦。HIV 蛋白酶通常用于切割病毒所编码的前体蛋白用以形成毒力核心，并且激活病毒复制所必需的反转录酶。而沙奎那韦是一种多肽类似物，它能代替 HIV 前体蛋白与酶结合，从而抑制病毒的成熟并减缓其在人体中的生长。许多像沙奎那韦一样由计算机设计出来的蛋白酶抑制剂，目前已经被用作治疗 AIDS 的化学药剂（表 20.5，图 20.28 和图 26.38）。基于结构和生化模型的计算机辅助设计和筛选，是一种有效、快速并且低成本的抗微生物药物设计方法。当然，在这些药物被用于临床治疗之前，也必须经过动物测试和临床检测。

新型抗微生物制剂

细菌噬菌体是一类以某种细菌个体为目标的病毒（见 16.1～16.6 节）。在某些特定情况下，用细菌噬菌体疗法（bacteriophage therapy）治疗动物感染和某些人体感染的做法已经有 80 多年的历史。噬菌体通过与细菌细胞表面某些特异成分的相互作用结合到细菌上。这种结合是特异性的，通常只针对某一特定的细菌种类。结合后的噬菌体进入到细菌细胞中复制，并最终杀死细菌宿主。这类制剂对人体的疗效大都没有经过测试，因此在使用上还存在一定的争议。细菌可以通过基因突变改变自身表面的噬菌体受体，或者降低细胞壁对噬菌体酶类的敏感性来抵抗噬菌体的入侵。因此，这种噬菌体疗法也无法避免抗性问题。

概念检查

新型抗微生物化合物被不断地发现和开发，用以对抗那些具有药物抗性的病原体，从而提高了治疗感染疾病的效力。现有药物的类似物常常被开发成为下一代抗微生物化合物。而计算机辅助药物设计，则成为发现新药的一个重要工具。

◆ 以现有药物类似物为基础的新药开发具有哪些优点和缺点？

◆ 在新药的寻找过程中，计算机辅助药物设计是如何节省时间和成本的？

复习题

1. 为什么说拾-存活时间（D）·对加热灭菌很重要？细菌中内生孢子的存在如何影响 D?（见 20.1 节）
2. 从分子水平上描述致死性辐射的作用。（见 20.2 节）
3. 与深度滤器相比，使用膜滤器的优点是什么？（见 20.3 节）
4. 为什么说核孔滤器在显微观察的样品分离中特别有用？（见 20.4 节）
5. 描述一下如何获得大肠杆菌杀菌剂的最小抑制浓度（MIC）。（见 20.5 节）
6. 比较防腐剂和消毒剂的作用，并说明消毒剂为什么不能用于活体组织？（见 20.6 节）
7. 为什么我们可用一个重要的标准来区分生长因子类似物和抗生素？请解释。（见 20.7 节）

8. 描述 β-内酰胺类抗生素特有的作用机制。（见 20.8 节）
9. 举出抑制蛋白质合成的抗生素的 3 种作用机制，并加以区分。（见 20.9 节）
10. 为什么抗病毒药物通常会表现出对宿主的毒性？（见 20.10 节）
11. 试举出对真菌有选择性毒力的化疗剂的几个作用位点。（见 20.11 节）
12. 举出抗生素抗性产生的 6 种机制。（见 20.12 节）
13. 从先导化合物开始，描述一下组合化学方法是如何被用于新药类似物的生产开发过程的？（见 20.13 节）

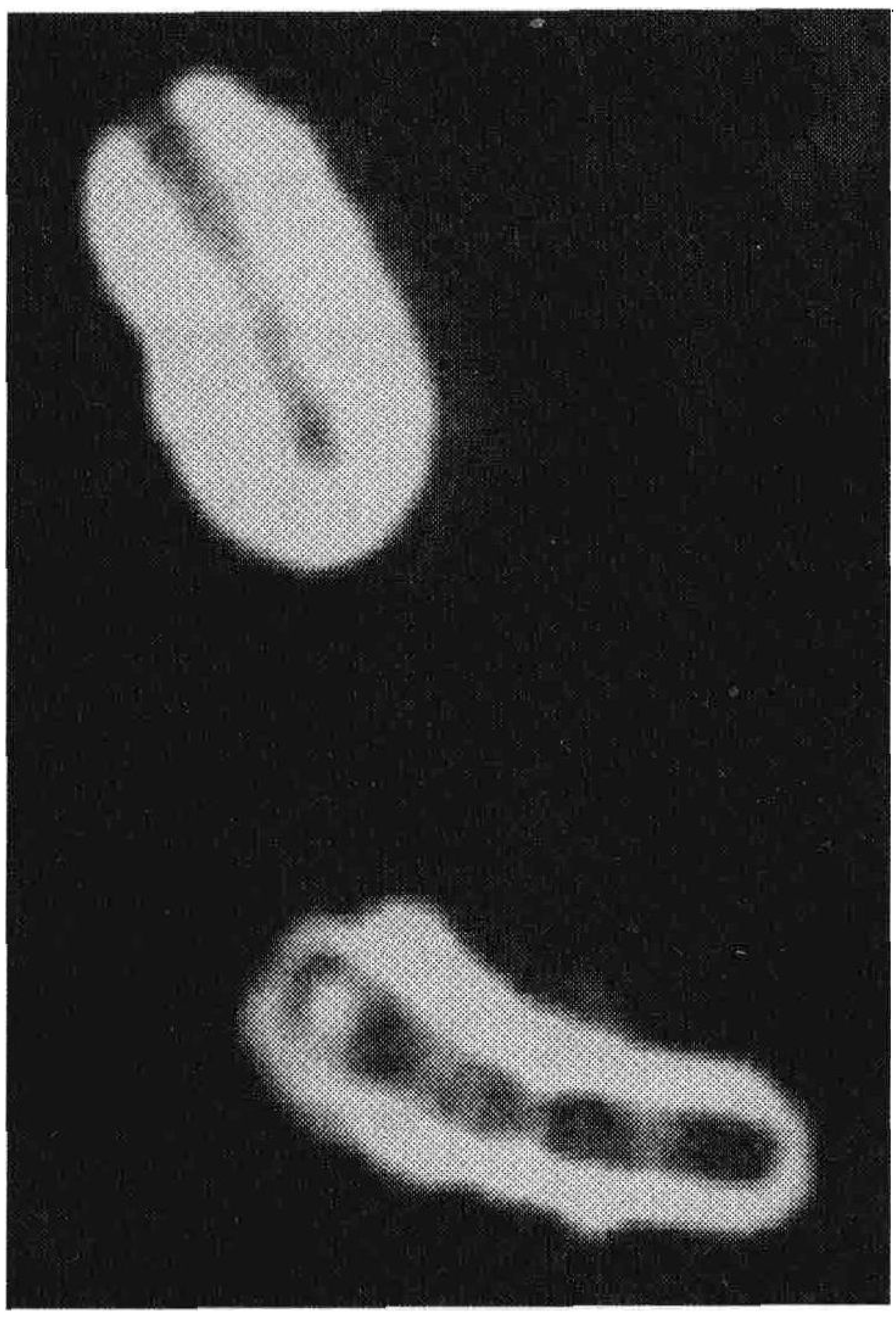
应用题

1. 利用辐射保存食品有哪些缺陷？你认为这些缺陷会危及人类健康吗？为什么？你如何检验被辐射破坏和污染的食物？
2. 过滤是一种普遍接受的针对液体的巴氏消毒法。设计一种对热敏感液体进行巴氏消毒的过滤系统。为什么过滤系统比巴氏消毒的加热系统更理想？
3. 尽管生长因子类似物可抑制微生物的代谢，但仅有少数可以应用。许多未开发的及一些正在广泛使用的试剂（如叠氮胸苷，表 20.5）显示出了对宿主细胞的强烈毒性。举出一种有效、且对宿主细胞低毒的生长因子类似物。你所选的这种试剂为何有低毒性？另外举出一种能有效控制传染病但对宿主细胞有毒的生长因子类似物。某些有毒试剂（如 AZT）在某些情况下仍被用来治疗传染病，为什么？在获得最大疗效的前提下，你将采取哪些预防措施来降低这类药物的毒性，并请说明为什么？
4. 设计一个实验来检测产生新型抗生素的微生物体。你将从哪一类或哪些微生物中筛选抗生素产物？在自然环境中，你从哪些地方能分离得到这些生物体？这些生物体所产生的抗生素将为其自身在自然环境中的生存提供何种优势？你将采用何种方法在体外检测你所发现的新抗生素的药效？
5. β-内酰胺类抗生素对细菌有明显的选择性毒力，但某些细菌却对这类抗生素有天然的抗性。请解释革兰氏阴性菌为何能在不存在抗性基因的情况下对大部分（并非全部）β-内酰胺类抗生素有抗性，并进一步解释部分 β-内酰胺类抗生素对这类微生物有效的原因。
6. 列出一种理想的抗病毒剂，特别指出有关选择性毒力方面应具有的特征。这类药物存在吗？这类药物的使用受哪些因素限制？
7. 真菌与病毒一样在化疗剂的使用上存在着特殊的问题。解释针对这两类微生物的化疗剂所存在的问题。并说出你是否同意前面的叙述。列出至少一类能对付这两种微生物的化疗剂。
8. 解释金黄色葡萄球菌获得对 β-内酰胺类抗生素抗性的分子机制。设计一套实验来逆转这一过程。你认为在实验室中可能达到这一目的吗？你的设计能否在实践中应用并促进针对抗生素抗性株的反向选择？

（肖　亮　译，陈月华　校）

21

微生物与人体的相互作用



引起炭疽的炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthrcis*）产生厚厚的多糖荚膜，图中染成绿色。荚膜通过干扰宿主的防御系统阻止宿主杀死细菌。

Ⅰ 对人体有益的微生物

Ⅱ 对人体有害的微生物

Ⅲ 毒力因子和毒素

Ⅳ 引起感染的宿主因素

词汇表

减毒（attenuation）：毒力的降低或丧失
菌血症（bacteremia）：血液内存在微生物
荚膜（capsule）：细胞周围存在的致密的多糖或蛋白质层
建群，定居（colonization）：病原体进入宿主组织进行的繁殖现象
龋齿（dental caries）：细菌感染导致的牙齿腐蚀
齿斑（dental plaque）：细胞外生聚合物及唾液成分包裹起来的细菌，存在于牙齿上
疾病（disease）：通过破坏宿主的功能损伤宿主
内毒素（endotoxin）：某些革兰氏阴性细菌（G^-）细胞壁的脂多糖成分，菌体裂解后是一种毒素
肠毒素（enterotoxin）：微生物体生长时分泌的蛋白质，对小肠有毒害作用
外毒素（exotoxin）：微生物体生长释放的蛋白质，是对宿主有毒害的蛋白质
溶血素（hemolysins）：能发挥溶血作用，裂解红细胞的细菌毒素
宿主（host）：为病原体提供生存条件的生物体
感染（infection）：生物体在宿主内的生长
侵袭力（invasiveness）：由病原体进入宿主体内及在体内扩散能力引起的致病性
下呼吸道（lower respiratory tract）：气管、支气管及肺
黏膜（mucous membrane）：上皮细胞与外部环境相互作用的表层
黏液（mucus）：上皮细胞分泌包被黏膜的可溶性糖蛋白
正常菌群（normal microbial flora）：一般在健康的身体组织中存在的微生物
医院感染（nosocomial infection）：在医院和通过医疗设备引起的感染
机会致病菌（opportunistic pathogen）：在宿主缺乏正常免疫力的条件下引起疾病的微生物
寄生物（parasite）：在宿主体内或体表生长并引起疾病的生物体
病原体（pathogen）：引起疾病的生物，通常是微生物
致病性（pathogenicity）：病原体引发疾病的能力
黏液层（slime layer）：多聚纤维的弥散层，典型的由多糖组成，在细胞外再构成一层外表面层
毒性（toxicity）：由病原体产生的毒素造成的致病性
上呼吸道（upper respiratory tract）：鼻咽、口腔及喉
毒力（virulence）：病原体表现的致病性程度

微生物遍布于人体口腔、内脏、分泌系统及生殖系统的表皮和黏膜层。这些微生物通常是有益的，甚至有时对于维持健康是必需的。然而，另外一些微生物通过直接或间接的途径繁殖、侵入并损害人体，这一引起疾病的过程称为感染。对人体有害的微生物称为病原体，通过多种措施来汲取人体养分，包括产生特有的吸附结构、生长因子、酶及生化毒素。这些因素常导致宿主的损伤，甚至死亡。

在第 20 章中，我们介绍了微生物学家为破坏和抑制微生物生长所采取的对策。此外，人体能够采取有效的措施来抑制和破坏大多数微生物入侵者。常规的物理学、解剖学及生物化学方法也可以使微生物感染的发生相对减少。

Ⅰ 对人体有益的微生物

我们从栖息于健康人体并在正常条件下对整体健康有益的微生物讲起。

21.1 微生物与人体的相互作用概述

人体暴露在微生物的环境中。日常活动中，我们所处的外界环境中有数不清的微生物。数以百计的微生物种类及数以十亿计的微生物个体，在人体表面或内部生长，称为正常菌群（normal microbial flora）。大多数微生物（并非全部）是良性的，其中一些对人体健康有利。

病原体

生长在宿主（host）表面或内部并对宿主造成损害的微生物称为寄生物（parasites）。微小的寄生物常称为病原体（pathogen）。宿主与寄生物相互作用的结果取决于寄生物的致病性（pathogenicity）。病原体造成宿主损害的能力是可变的，这与宿主对病原体的抗性（resistance）和易感性（susceptibility）有关。机会致病菌（opportunistic pathogen）只有在宿主缺乏抵抗力的条件下才引起疾病。

不同病原体的致病性差异迥然。毒力（virulence）是用来定量表示致病性的程度，一般用在给定的时间内所能引发病变的细胞数目来表示。但是，无论是寄生物的毒力还是宿主的抵抗力，都不是恒定不变的，因为随着病原体或宿主条件的改变，宿主与病原体之间的关系也是一个动态变化的过程。

感染和疾病

不论其对宿主有无造成伤害，感染（infection）是指微生物在宿主内的生长繁殖。疾病（disease）则指对宿主造成损害或伤害，从而影响宿主行使功能。感染和疾病是不同意义上的两个概念，因为微生物在宿主内的生长并不总对宿主有伤害。因此，正常菌群成员可能产生感染，但很少引起疾病。然而，正常菌群有时也会导致疾病，前提是宿主抵抗力降低，像癌症和艾滋病就是例子（见 26.14 节）。

宿主与寄生物的相互作用

动物身体可以为许多微生物提供合适有利的生长环境。动物体内含许多有机化能生物生长所需要的营养物质和生长因子，而且动物体还能提供相对稳定的 pH 环境和渗透压，尤其温血动物具有恒定的体温。但是，不能认为动物体是微生物唯一的生长环境。另外，每一个部位或每一个器官与其他部位或器官都有所不同，因此可以为微生物提供一个有选择的环境。这样有选择性的生活环境，对某些微生物来说可能比对其他微生物更适合生长。

例如，表皮、呼吸道、肠胃道等每一个器官都能提供一种极为不同的物理和化学条件，不同的微生物可以有选择地在这些不同的环境条件下生存。相对干燥的皮肤对有坚

固防护的微生物在脱水环境中存活有利，如革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）（见 26.9 节）；肺部的高氧条件利于专性需氧的结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）的生长（见 26.5 节）；大肠的缺氧环境利于专性厌氧的梭菌属细菌（*Clostridium*）生长（见 12.20 节）。动物体也具有多变的防御机制，这些机制可以共同阻碍或抑制微生物的侵入和生长。最后能够成功地在宿主中生成菌落的是那些已演变成具备克服这些防御机制的微生物。

在动物体内，经常出现感染的位点是黏膜（mucous membrane）。黏膜是由单层或多层上皮细胞（epithelial cell）组成的，这种紧密堆积的细胞直接与外部环境相接触。在动物体全身都可以找到黏膜（mucus），如口腔、咽、食道及泌尿生殖道、呼吸道和胃肠道。黏膜经常被黏液保护层所覆盖，这种黏液保护层主要是糖蛋白。当细菌在黏膜处接触宿主组织时，这些细菌既可以疏松地与黏膜表面结合，也可以紧密地与黏膜表面结合。如果细菌疏松地结合在黏膜上，采用一般物理的方法就可以把细菌处理掉。但它们也可以特异性地附着在上皮细胞表面，这是由于寄生物与宿主之间特异的细胞与细胞识别造成开始进入感染过程。当这些出现以后，黏膜障碍被突破，病原体可以侵入组织深层（图 21.1）。

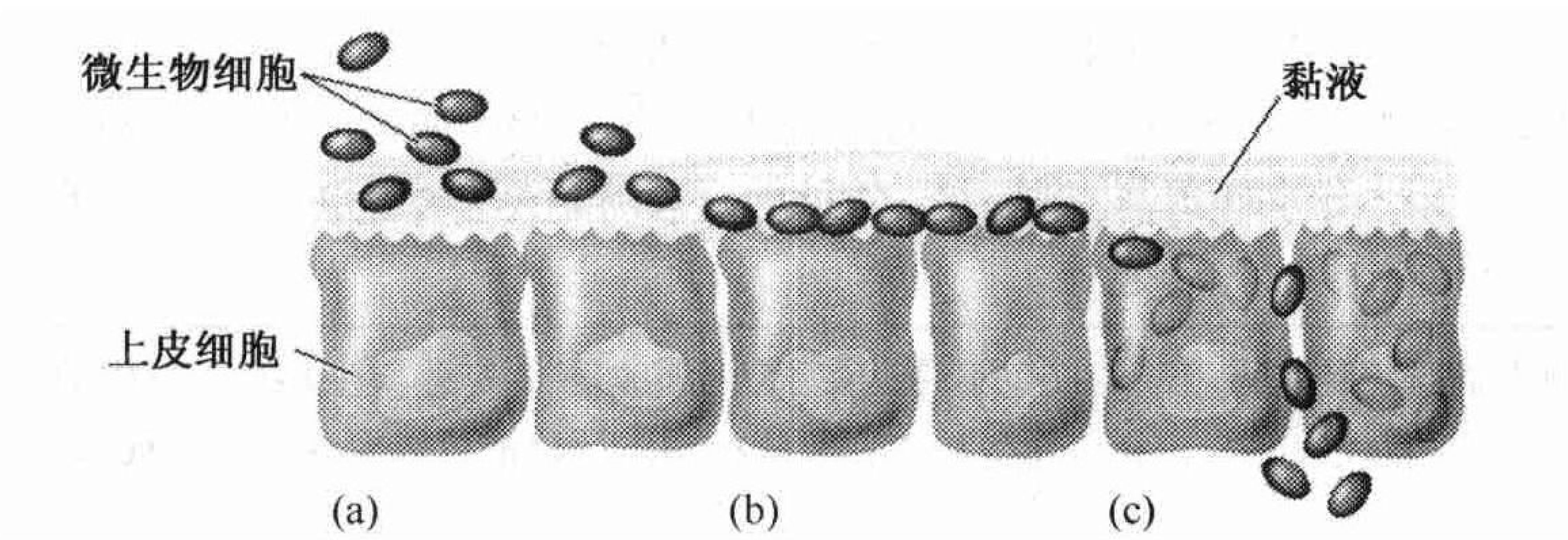


图 21.1　细菌与黏膜表面的相互作用。（a）疏松结合。（b）吸附。（c）进入黏膜细胞。

微生物几乎存在于所有动物体暴露在外部环境中的部位，如皮肤表面、口腔、呼吸道、肠道和泌尿生殖道。而在器官的内部、血液中或身体中的淋巴系统中，一般不会发现微生物存在。如果在这些组织中任意一处发现有相当数量的微生物，一般就会呈现疾病状态。

表 21.1 列出了一般在体表面发现的某些主要类型的微生物。在黏膜表面有各种各样的伴生微生物存在，部分原因是各种各样的黏膜表面屏障具备湿润和适宜的生存环境，再就是由于黏膜表面有巨大的表面积（$400m^2$）。例如，具有特殊功能的黏膜器官（如小肠），它需要如此巨大的特殊化的表面去运输营养物质，这样表面也就可作为微生物的生长的部位。这里将介绍一些黏膜表面微生物与宿主的相互作用。

表 21.1　人体正常菌群中有代表性的微生物

解剖位点	微生物[a]
皮肤	不动杆菌属（*Acinetobacter*）、棒杆菌属（*Corynebacterium*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、马拉色菌属（真菌）（*Malassezia*）、微球菌属（*Micrococcus*）、瓶形酵母属（真菌）（*Pityrosporum*）、丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）、变形菌属（*Proteus*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）

续表

解剖位点	微生物*
口腔	链球菌属（*Streptococcus*）、乳酸菌属（*Lactobacillus*）、梭杆菌属（*Fusobacterium*）、韦荣氏球菌属（*Veillonella*）、棒杆菌属（*Corynebacterium*）、奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）、放线菌属（*Actinomyces*）、地霉菌（真菌）（*Geotrichum*）、假丝酵母属（真菌）（*Candida*）、二氧化碳噬纤维菌属（*Capnocytophaga*）、艾肯菌属（*Eikenella*）、普雷沃氏菌属（*Prevotella*）、螺旋体（微生物群）
呼吸系统	链球菌属（*Streptococcus*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、棒杆菌属（*Corynebacterium*）、奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）、嗜血菌属（*Haemophilus*）
胃肠道	乳酸菌属（*Lactobacillus*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、拟杆菌属（*Bacteroides*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）、真杆菌属（*Eubacterium*）、消化球菌属（*Peptococcus*）、消化链球菌属（*Peptostreptococcus*）、瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）、梭菌属（*Clostridium*）、埃希氏菌属（*Escherichia*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、变形菌属（*Proteus*）、肠球菌属（*Enterococcus*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）
泌尿道	埃希氏菌属（*Escherichia*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、变形菌属（*Proteus*）、奈瑟氏球菌属（*Neisseria*）、乳酸菌属（*Lactobacillus*）、棒杆菌属（*Corynebacterium*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、假丝酵母属（真菌）（*Candida*）、普雷沃氏菌属（*Prevotella*）、梭菌属（*Clostridium*）、消化链球菌属（*Peptostreptococcus*）、脲支原体属（或脲原体属）（*Ureaplasma*）、支原体属（*Mycoplasma*）、分枝杆菌属（*Mycobacterium*）、链球菌属（*Streptococcus*）、球拟酵母属（真菌）（*Torulopsis*）

* 此表所列微生物既不是毫无疏漏的，也不是存在于所有个体中。有些微生物在人群中的传播受年龄（成人或儿童）、性别、特殊致病条件的制约。有些微生物则在身体的很多部位都可以发现。真菌被特别标出。

概念检查

动物体可以为许多微生物的生长提供良好的环境，其中的大多数并非有害。有害的微生物成为病原体（pathogen）。在宿主表面生长的病原体，常在黏膜表面，可能会导致感染和疾病。微生物引起或抑制疾病的能力受宿主与寄生物相互作用的影响。

◆ 区别感染（infection）和疾病（disease）的概念。

◆ 为什么身体某一部位比其他部位更适合微生物生长？

21.2 皮肤上的正常菌群

一般成年人的皮肤表面积为 $2m^2$，体表面化学组成和水分含量有很大不同。图 21.2 显示了皮肤的解剖模型及细菌有可能存在的区域。皮肤的表面（外表皮）并不是微生物生长的适宜之地，因为外表皮要经受周期性的干燥。

许多体表微生物都直接或间接与分泌腺（apocrine gland）（汗腺）相伴而生。这些分泌腺主要局限于腋下、生殖器官、乳头及脐带处。在幼儿时代，内分泌腺是无活性的，只有到了青年时期才发育成熟并具有完善的功能。与光滑又干燥的皮肤表面相比，在这些温暖、湿润的皮肤表面会有较多细菌群体存在。腋窝下气味生成是由于细菌在内

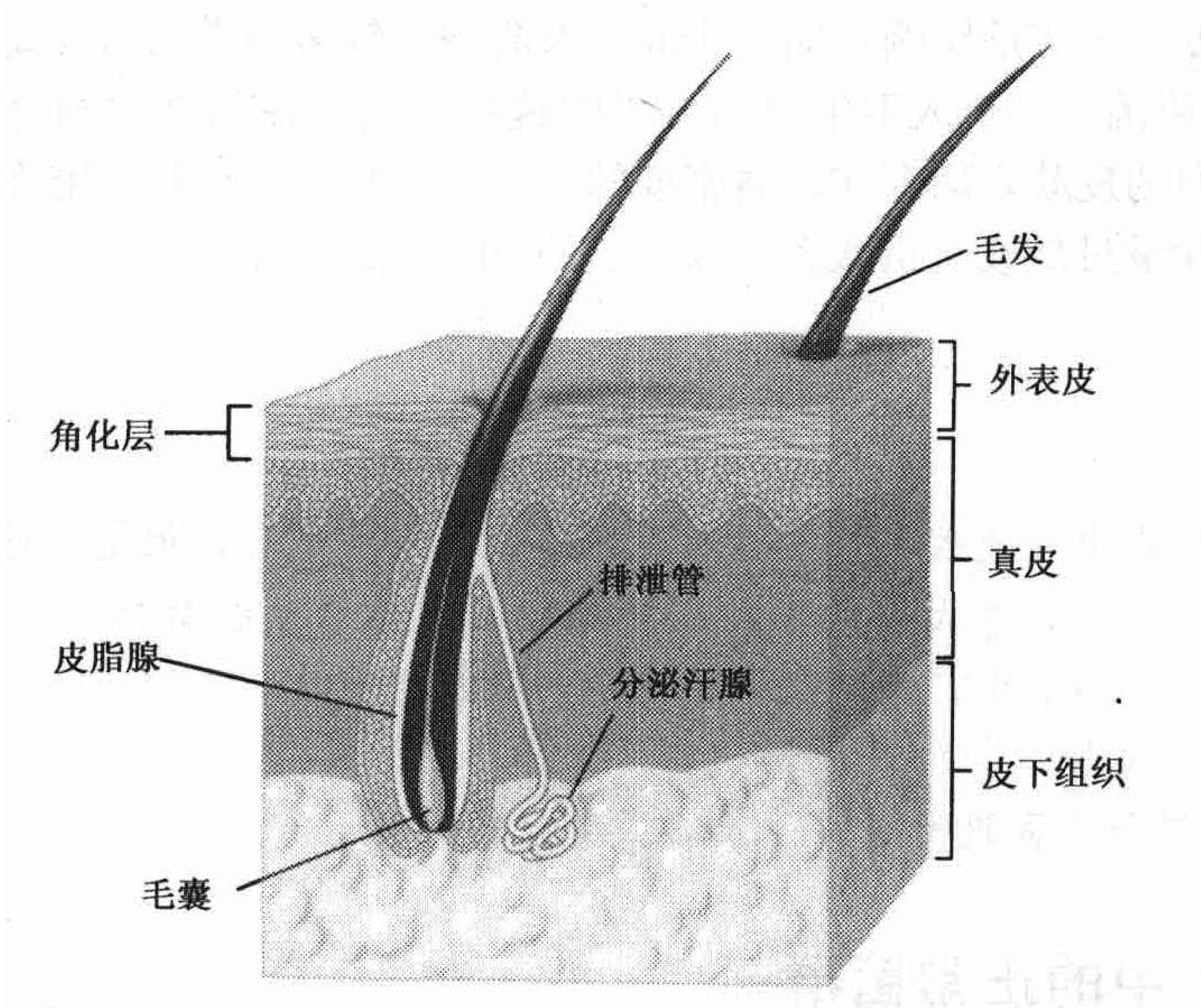


图 21.2 人体皮肤解剖示意图。微生物主要与汗导管及毛囊有关。

分泌腺腺体分泌物上活动的结果。通过无菌操作收集的内分泌腺的分泌物是无气味的，但若介入细菌就会变成有臭味的。每一个毛囊都与皮脂腺（sebaceous gland）相连，皮脂腺可分泌一种光滑的液体。毛囊可以为许多微生物及各种各样的好氧和厌氧细菌及真菌提供一个非常有吸引力的生存之地，尤其是在皮肤表面下部，微生物最多。皮肤腺体分泌物富含微生物生长所必需的营养物质，如含有大量的尿素、氨基酸、盐类、乳酸和脂类。人体分泌物的 pH 总是酸性的，一般 pH 在 4～6。

皮肤上正常的微生物群落既可以是暂时存在（transient）的，也可以是长期存在（resident）的。皮肤作为外部器官，会不断地被接种上暂时存在的微生物，这些微生物实际上不能繁殖，并且常常会死亡。长期存在的微生物不仅仅能在皮肤上继续留存，而且还能够进行繁殖。皮肤正常的微生物群落主要包括革兰氏阳性菌少数几个属（表 21.1）。这些细菌包括葡萄球菌属（*Staphylococcus*）的几个种和许多厌氧和好氧的棒状杆菌属。在棒状杆菌属中，痤疱丙酸杆菌（*Propionibacterium acnes*）可能引发和促进粉刺产生。

正常的表皮微生物群落中，G^- 菌总是占少数，即使是肠道微生物［如大肠杆菌（*Escherichia coli*）］也必须连续不断地通过食物渣滓的沾染而接种到肠道表皮的表面。可以认为皮肤表面缺乏 G^- 菌菌落主要是由于 G^- 菌没有能力与 G^+ 菌进行竞争。因为 G^+ 菌更适合在皮肤干燥的条件下生存。不动杆菌属（*Acinetobacter*）是个例外，它通常是可以在皮肤表面发现的几种革兰氏阴性菌中的一种。皮肤表面一般不会有酵母菌存在，但偶尔在头皮上会发现亲脂酵母卵状糠疹癣菌（*Pityrosporum ovalis*）。在缺乏宿主抗性的人群，如获得性免疫缺陷患者（见 26.14 节）或缺乏正常细菌群落的人，假丝酵母（*Candida*）和其他真菌便会生长并导致严重的皮肤感染。

虽然长期居存的微生物群落大体上可以保持恒定，但许多因素可以影响正常微生物群落的原始状态和范围：①天气状况使温度上升和湿度增大，这就可以增加皮肤上正常

微生物群落的密度。②年龄影响：幼儿比成年人会携带较多种类的微生物群落和较多的 G^- 菌及潜在的病原菌。③个人卫生习惯会影响这些长期居住的微生物群落，不讲卫生的个人经常在他们的皮肤表面存在较高密度的微生物群落。微生物不能在皮肤上生存常常是因皮肤水分含量过低或有机酸含量高引起的 pH 降低所致。

概念检查

皮肤出现干燥或出现酸性条件常不利于许多微生物的生长，但是一些湿润地区，尤其是汗腺周围，常常是革兰氏阳性菌和皮肤其他正常的微生物群落成员生成菌落的部位。环境和宿主因素影响正常皮肤微生物群落的数量和质量。

◆ 比较皮肤与黏膜组织的表面积。

◆ 描述能在皮肤表面进行正常生长的微生物的特性。

21.3 口腔中的正常菌群

口腔是较为复杂和不均匀的微生物栖息地之一。一方面，唾液中含有大量微生物所需的营养物质，但是不能作为良好的培养基，原因在于其营养物质浓度低，而且唾液中含有抗菌成分。例如，唾液中的溶菌酶（lysozyme）是一种可以水解细菌细胞壁中肽聚糖糖苷键的酶，使细菌细胞壁交联度减弱及破裂（见 4.8 节）。乳酸过氧化酶（lactoperoxidase）是一种在牛奶和唾液中都存在的酶，通过反应产生单体氧而杀死细菌（见 6.15 节和 22.2 节）。不过尽管有抗菌物质存在，食物颗粒和上皮细胞残骸会使口腔成为微生物生存、损坏组织和产生疾病的一个非常有利的栖息地。

牙齿和齿斑

牙齿包括磷酸钙结晶体生成的矿物质基体（釉质）和内部的牙齿活性组织（牙质和髓质）（图 21.3）。在一个人生命的最初几个月（无牙时），口中发现的细菌多数是厌氧或耐氧菌，包括一些少量的好氧菌。在牙齿长出来之后，微生物群落与厌氧微生物之间的平衡有了显著的改变，而且许多细菌专门在牙齿表面和牙齿间裂缝中生长。

细菌在光滑的牙齿表面生成菌落源于单个细菌细胞与牙齿的紧密附着。开始是一个干净的牙齿表面，先是唾液中的一种酸性糖蛋白附着在牙齿表面生成几微米厚的有机薄膜层，这个薄膜层可以为细菌的生长和形成菌落提供一个较为坚固的附着位点（图 21.4）。在这种糖蛋白薄膜层生成的菌落是高度特异性的，只有链球菌（*Strptococcus*）几个属，主要是血链球菌（*Streptococcus sanguis*）、表兄链球菌（*Streptococcus. sobrinus*）、变异链球菌（*Streptococcus mutans*）和缓征链球菌（*Streptococcus mitis*）可以在糖蛋白膜上生成菌落。这些微生物大范围的生长结果都形成一个厚厚的细菌层，称为齿斑（dental plaque）（图 21.5 和图 21.6）。

如果齿斑继续形成，通常是梭杆菌属（*Fusobacterium*）的丝状细菌开始生长。这些丝状细菌嵌入链霉菌属形成的基体中，并且垂直向牙齿表面扩展。这样生成一个更厚的细菌层。除了链霉菌以外，与丝状细菌相结合的还有螺旋菌［如疏螺旋体属

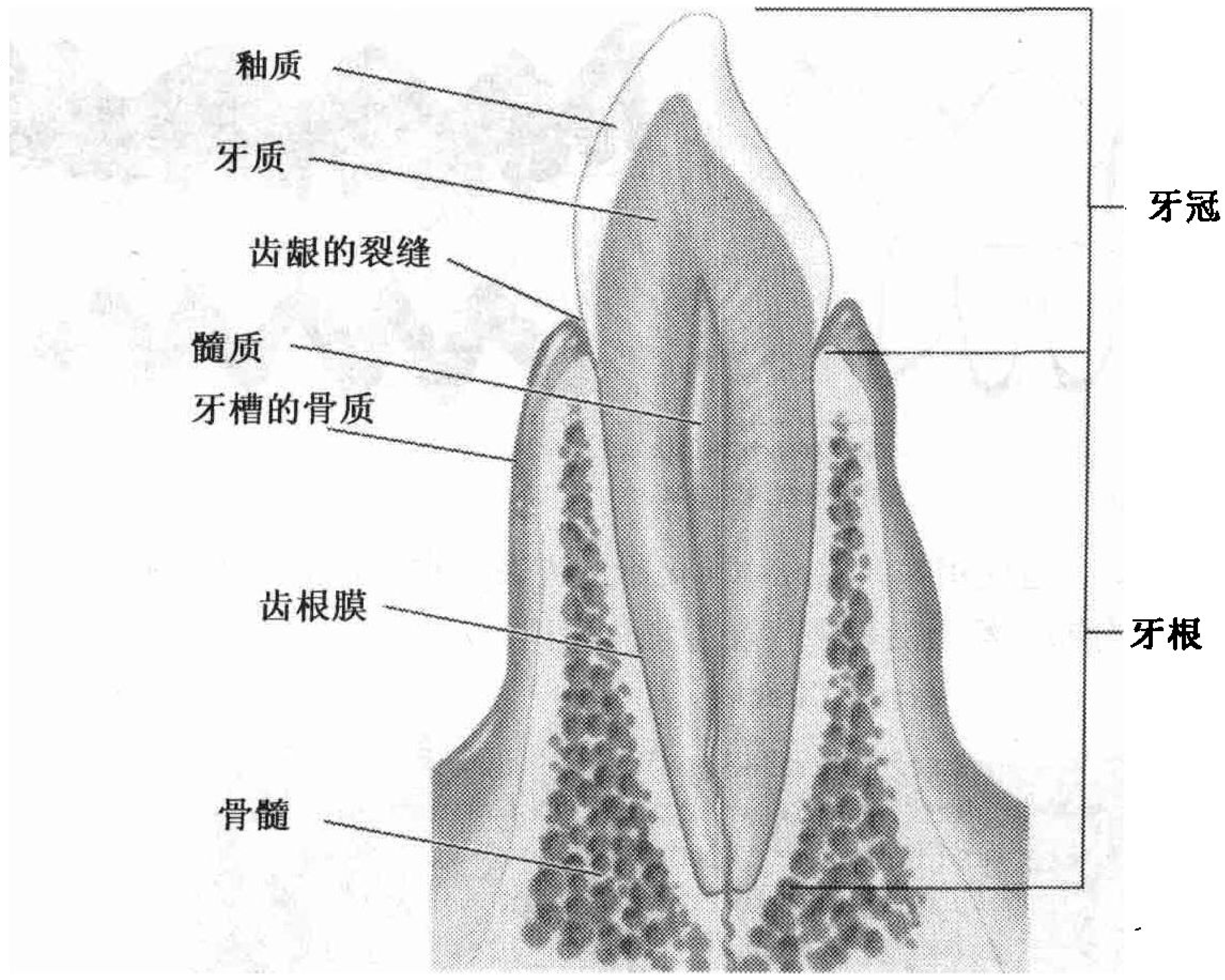
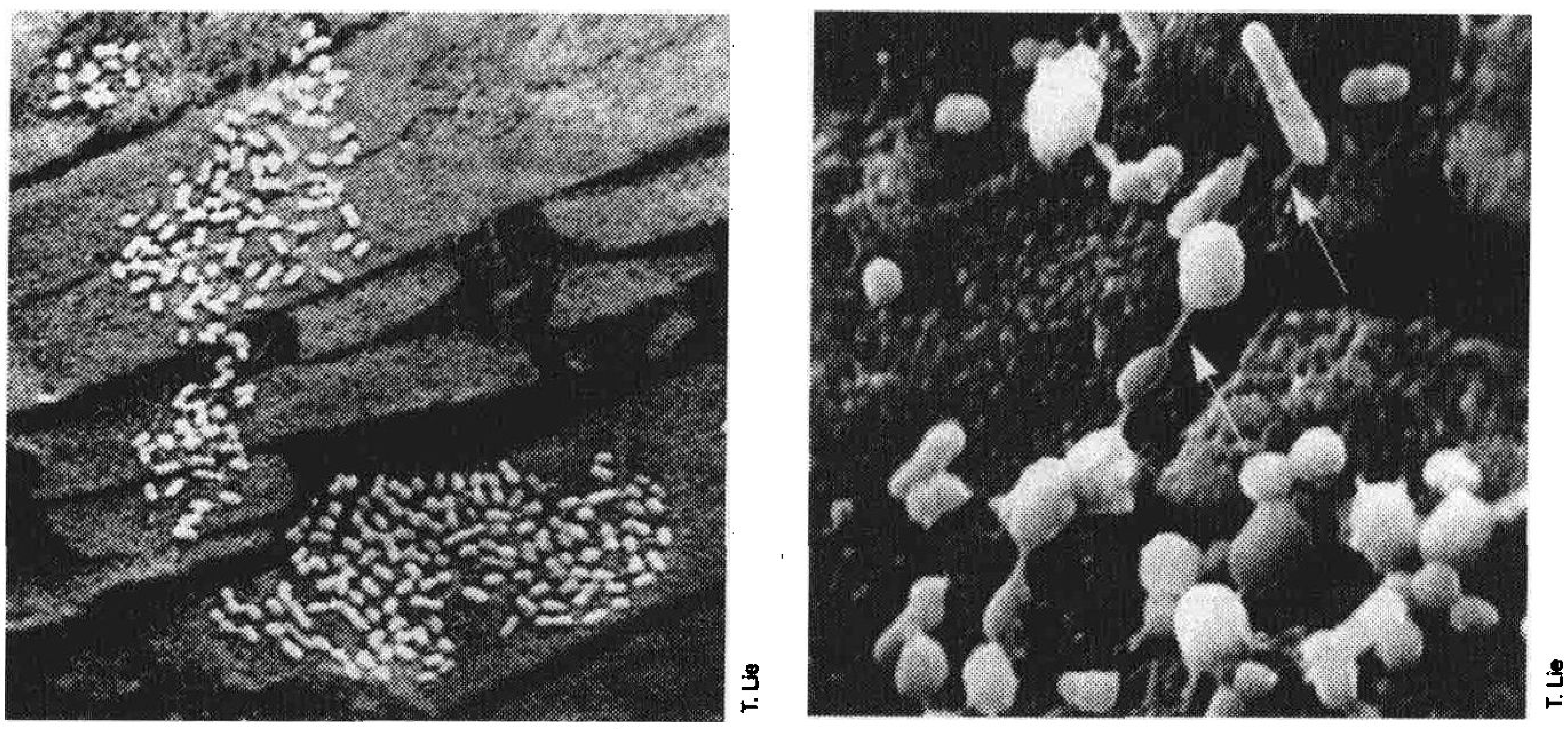


图 21.3 牙齿剖面示意图。显示在齿龈中固定牙齿的周围组织。

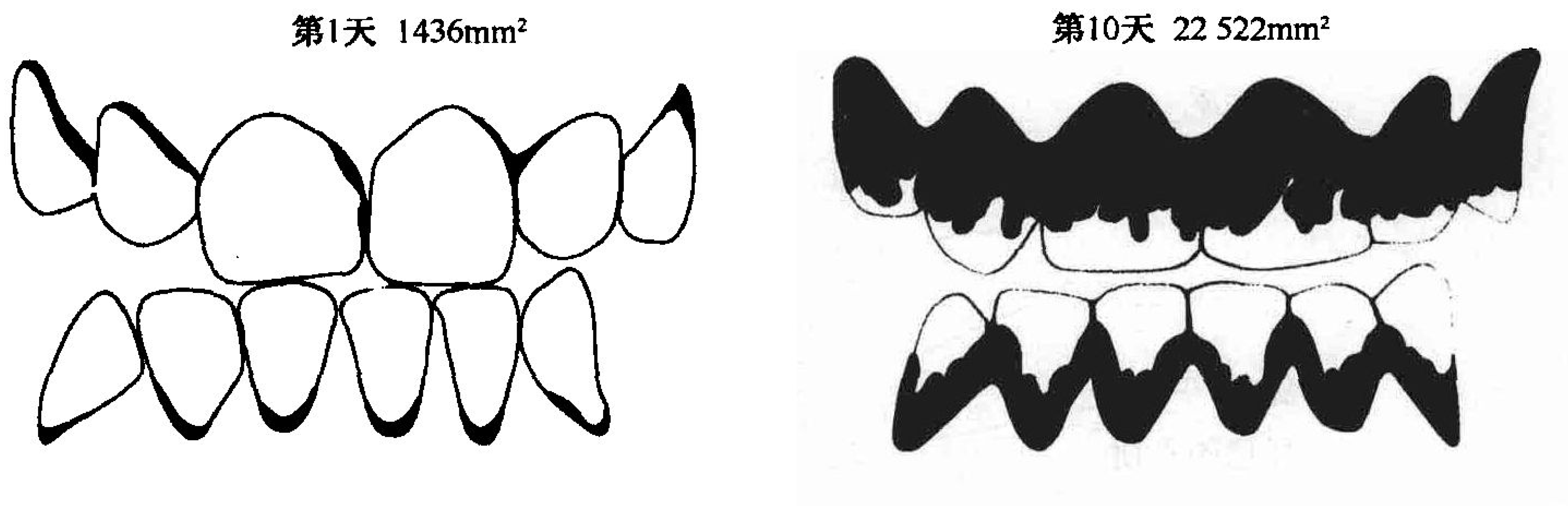


(a) (b)

图 21.4 细菌菌落。(a) 把一个模拟牙齿表面的物体插入嘴中，6h 后在上面所产生的细菌菌落。(b) a 图细菌菌落高倍数放大，便于观察微生物形态的多样性以及把微生物连在一起的黏液物质 (箭头所指)。

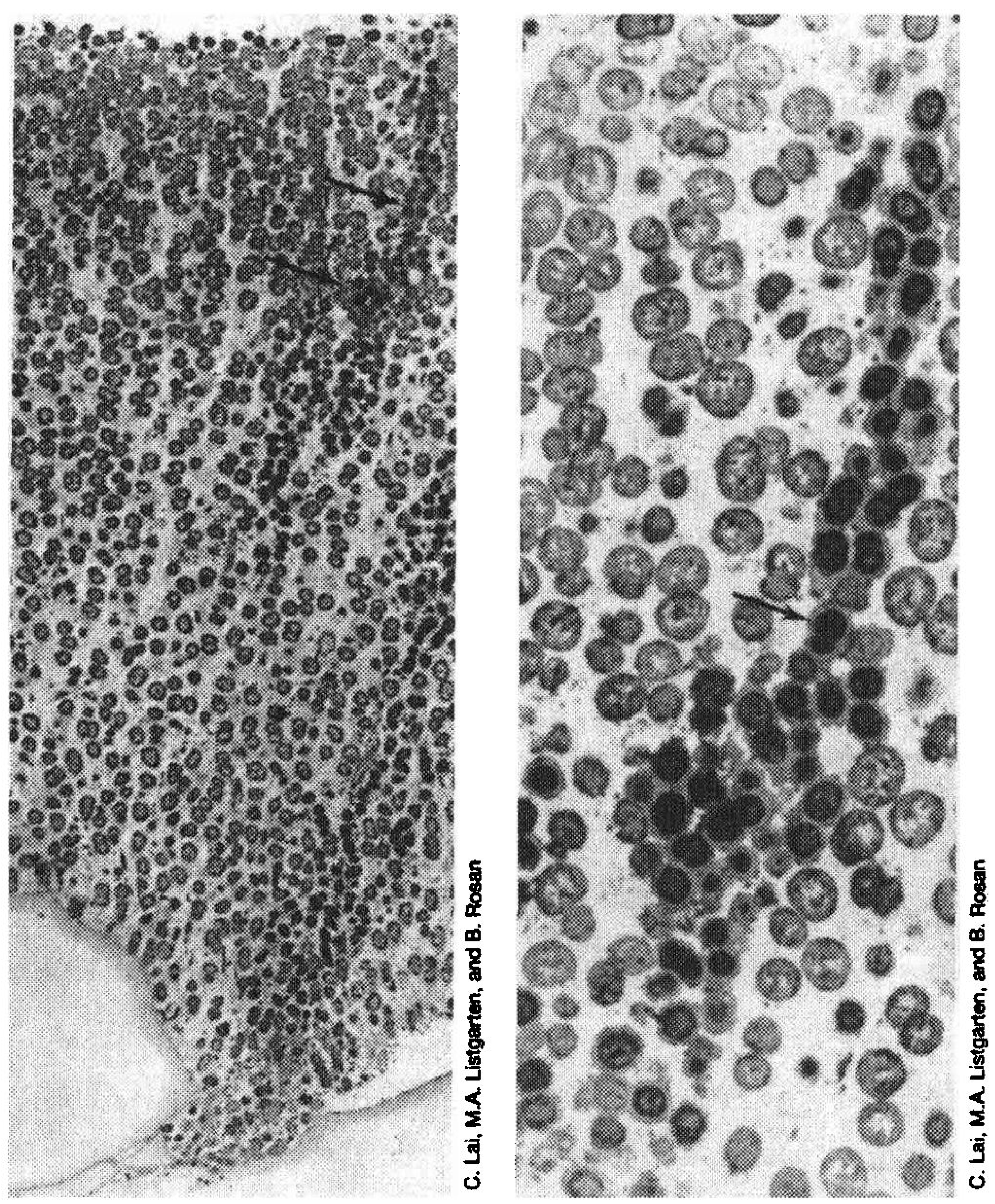
(*Borrelia*)] (见 12.33 节)、G^+ 菌和 G^- 菌。在很大的齿斑中，丝状微生物 [如放线菌属 (*Actinomyces*)] 可能占优势。

从嘴是氧进入通道的角度考虑，牙齿上的这些微生物是厌氧的似乎是不可思议的。这很可能是通过兼性厌氧细菌在牙齿的有机物上进行的好氧生长而形成的一种缺氧环境，因为齿斑形成密集的基质减少了扩散到牙齿表面的氧气。齿斑上的微生物群落存在于它们自身所制造的部分微环境中，并且面对口腔这样一个多变的大环境，它们又能维持自身的存在。



(a) (b)

图 21.5 齿斑分布。通过使用暴露媒介物所揭示的齿斑，在刷过的牙齿（a）和未刷过的牙齿上（b）齿斑分布。给出的数字代表齿斑总面积。



(a) (b)

图 21.6 齿斑超薄切片电子显微镜照片。底部是齿斑基体，上部是暴露在口腔中的部分。(a) 低放大倍数的电子显微镜照片，占优势的微生物主要是链球菌（*Streptococci*）。表兄链球菌（*Streptococcus sobrinus*）已经用抗体-微生物化学技术进行了标记，所以这些细菌看起来颜色深。可以看到2条清楚的链（箭头所示），此处所示的齿斑总体厚度约 20μm。(b) 较高放大倍数电子显微镜照片显示表兄链球菌所在区域（箭头所示）。可以看到围绕着表兄链球菌有大范围多糖包被。

牙齿龋齿

当齿斑积累，菌群局部产生高浓度有机酸，牙齿釉质脱钙（图 21.3），进而导致牙

齿龋齿（牙齿腐烂分解）。因此，牙齿腐烂是由于微生物引起的一种感染性疾病。光滑的牙齿表面经常被舌头、唾液及牙刷或食物咀嚼等的摩擦作用而进行清除，这样使它们对龋齿有一定的抵制作用。牙齿表面存在有裂缝，这里常有食物颗粒残留，此处也是牙齿腐烂的主要位点。

高含糖量的食物尤其易生龋齿，因为乳酸菌可发酵糖产生乳酸。一旦这种坚硬的组织（牙齿釉质）被破坏，通过细菌分泌的蛋白质水解酶就可以水解牙齿的基体部分。微生物就可以穿透更深部位，对基体进行降解，但此过程的后期进行极其缓慢而且高度复杂。组织中的钙化结构在龋齿的程度方面也起着非常重要的作用。把氟化物加入到磷酸钙的水晶基体中，对酸的分解就会有很强的抵制力。因此常在饮用水和牙膏中加入氟化物以有助于防止龋齿。

龋齿中包含两类微生物，即表兄链球菌（*Streptococcus sobrinus*）和变异链球菌（*Streptococcus mutans*），二者都是乳酸产生菌。表兄链球菌可以在光滑的牙齿表面形成菌落，因为它可以特异性地吸附在唾液糖蛋白上，这种细菌可能就是在光滑牙齿表面造成损害的主要微生物（图 21.6）。变异链球菌主要在裂缝和小断裂处发现，它具备黏附在牙齿表面的能力，这可能是由于它能产生一种具有强附着力的含葡聚糖的多糖的缘故（图 21.7）。只有当蔗糖存在时，变异链球菌才能通过葡聚糖蔗糖酶作用产生葡聚糖（dextransucrase）：

$$n\ \text{蔗糖} \xrightarrow{\text{葡聚糖蔗糖酶}} \text{葡聚糖}(n\ \text{葡萄糖}) + n\ \text{果糖}$$

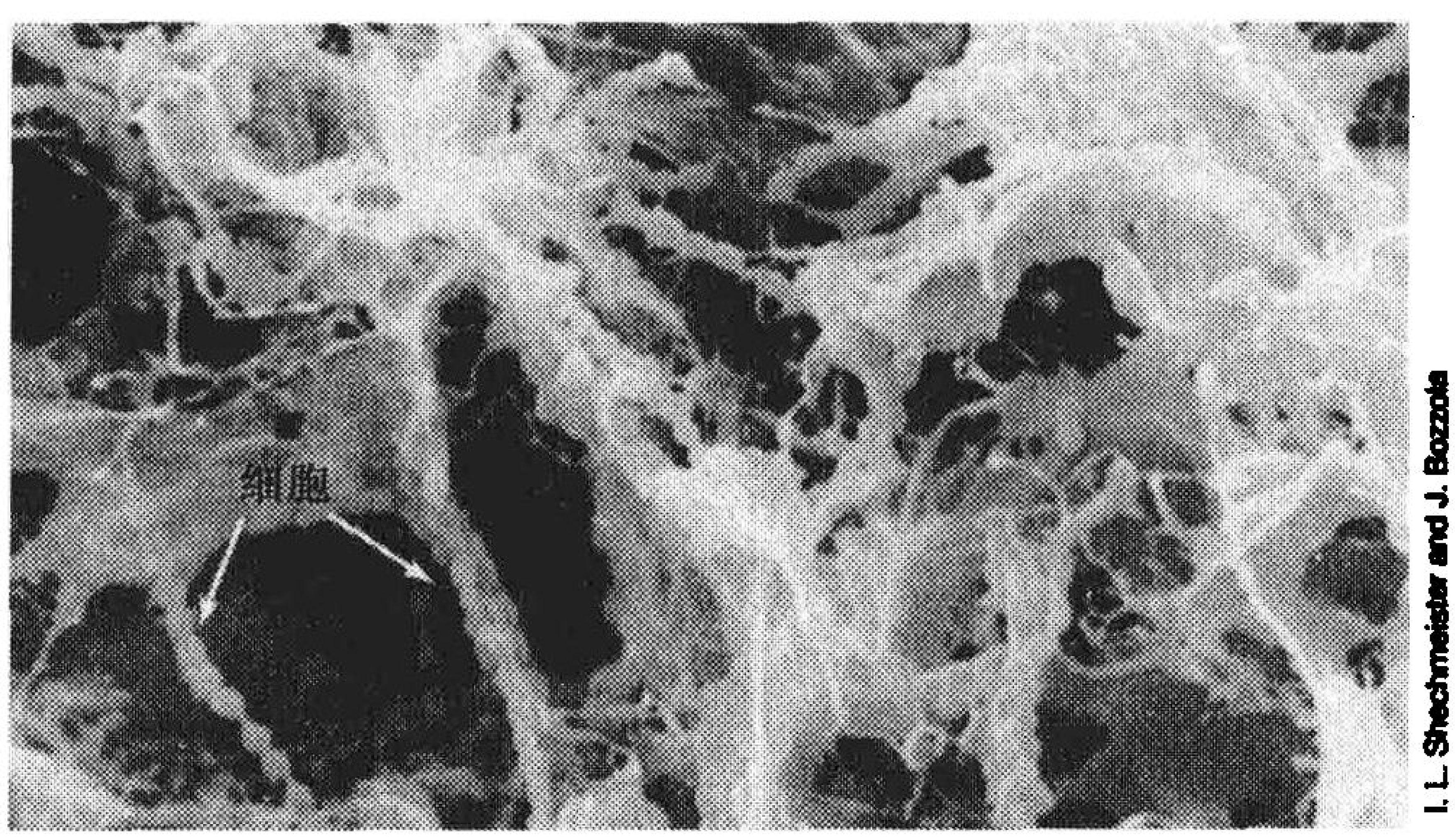


图 21.7　生龋齿的细菌一变异链球菌（*Streptococcus mutans*）扫描电子显微镜照片。
黏稠的右旋糖苷物质可以看作大量丝状颗粒物。单个细胞直径 1μm。

在众多人群中，每个人对牙齿腐烂敏感性有很大不同，它受个人先天性格、饮食及其他外来因素的影响。例如，在大多数发达国家人群的食物表中都有蔗糖，蔗糖之所以容易导致龋齿产生，是因为蔗糖可以作为葡聚糖蔗糖酶的底物。通过对口腔链霉菌分布的研究，就可以明显的显示出存在的表兄链球菌和变异链球菌与龋齿程度之间的直接关系。例如，在美国和西欧国家，80%～90%的人牙齿有变异链球菌菌落，并且龋齿的形成几乎是一个普遍的现象；相比之下，在坦桑尼亚儿童就没有龋齿出现，这些人的龋齿斑上也不会有变异链球菌菌落存在，这大概就是由于他们所食用的食物中缺少蔗糖的缘故。

口腔中的微生物还有可能产生其他种类的感染。多种微生物可感染齿龈裂缝处或其底部的齿根膜（periodontal pockets）区域，引起齿龈（gingivitis）组织发炎（齿龈

炎)，导致组织及骨损坏的齿根膜疾病（periodontal disease)。一些种类包括纺锤状细菌（*Fusiform bacteria*)（长、细的革兰氏阴性棒状菌)，如兼性厌氧的二氧化碳噬纤维菌（*Capnocytophaga*)；需氧的罗氏菌（*rothia*)、一类产甲烷生物，如产甲烷杆菌（*Methanobrevibacter*）及古生菌（*Archaea*）中成员也可能存在（见 13.4 节)。

概念检查

细菌在牙齿表面生成一厚层称为齿斑。齿斑中的微生物可以进一步产生能在其上生成菌落的黏性物质。齿斑中的产酸微生物可以损害牙齿表面，进而使龋齿形成。多种微生物可导致龋齿和齿根膜疾病。

◆ 厌氧微生物如何在口腔中生存?

◆ 龋齿是一种感染性疾病吗? 对你的回答至少给出一种解释。

◆ 明确乳酸细菌在牙齿腐蚀中起的作用。

21.4 胃肠道内的正常菌群

图 21.8 显示了胃肠道的解剖示意图。人的胃肠道是食物消化的部位，由胃、小肠和大肠组成。胃液的 pH 很低（pH 约为 2)，因此胃是阻碍微生物进入肠道的化学屏障，因此，胃内容物含细菌数较低。但正常个体的胃壁却含有类似幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）的微生物菌落，在敏感宿主中会引起溃疡（见 26.10 节)。肠道包括小肠和大肠，进一步还可以把大肠（large intestine）和小肠（small intestine）分成不同的解剖结构。

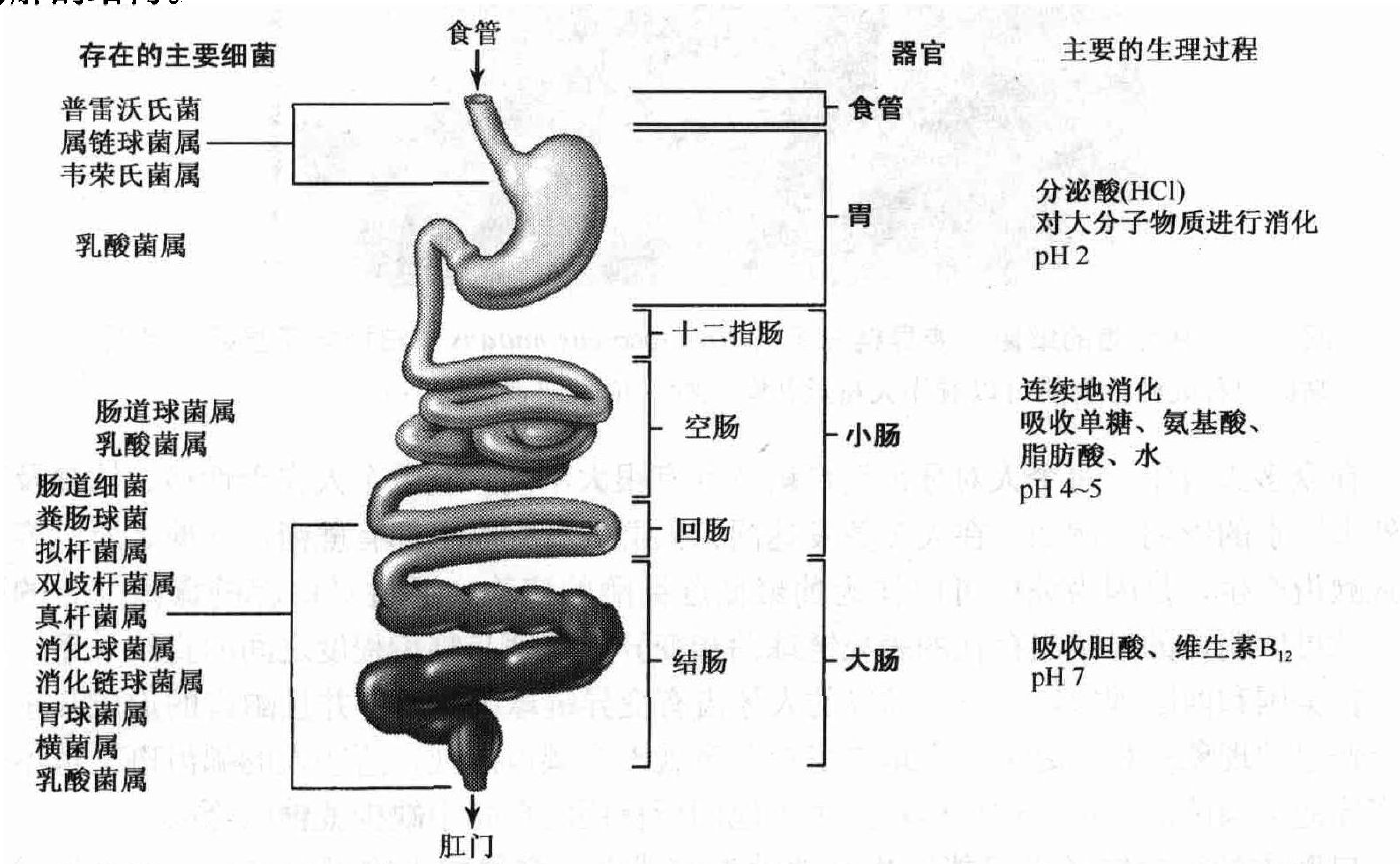


图 21.8 人体消化道示意图。显示出健康人消化道内非致病性微生物的功能和分布。

人体肠道菌落的组成与饮食有很大的关系。例如，相对于素食者，食用大量肉类的人表现出高水平的水解蛋白质的拟杆菌属（*Bacteroides*），低水平的大肠菌和乳酸菌。肠道中发现的典型的微生物见图 21.8。

小肠

小肠（small intestine）可以分为十二指肠（duodenum）和回肠（ileum），二者由空腔（jejunum）相连。前者与胃相连，呈一定酸性，与胃相似，缺乏微生物群落。从十二指肠到回肠，酸性逐渐减弱，形成一个 pH 梯度，细菌数随着这个梯度开始增加。在回肠下部，在肠腔中发现细菌与消化的食物混合存在。一般细胞数为 $10^5 \sim 10^7$ 个/g 肠存物。

大肠

回肠倒转进入盲肠（cecum）。盲肠是回肠与大肠（large intestine）的连接部分。结肠构成了大肠的剩余部分。在大肠中，存在大量的细菌，由于存在非常多的细菌，可以把这部位看作是一个特殊化的发酵容器。生活在肠腔中的微生物可以利用食物消化的某些产物作为营养成分（表 21.1）。兼性厌氧菌（如大肠杆菌），存在量较其他细菌少，一般每克大肠内容物含兼性厌氧细菌总数少于 10^7 个。兼性厌氧菌的代谢活动可以消耗以任何形式存在的氧，因此使大肠变成严格的厌氧环境，有利于专性厌氧微生物的大量生长。这些厌氧微生物中许多都是梭状，菌的末端附着在肠壁的微小凹陷处（图 21.9）。其他的专性厌氧微生物包括梭菌属（*Clostridium*）和拟杆菌属（*Bacteroides*）。专性厌氧微生物的总数是相当大的，一般每克肠内容物含 $10^{10} \sim 10^{11}$ 个细胞，拟杆菌属（*Bacteroides*）各不同属构成了大肠专性厌氧菌的大部分。除此之外，粪肠球菌（*En-*

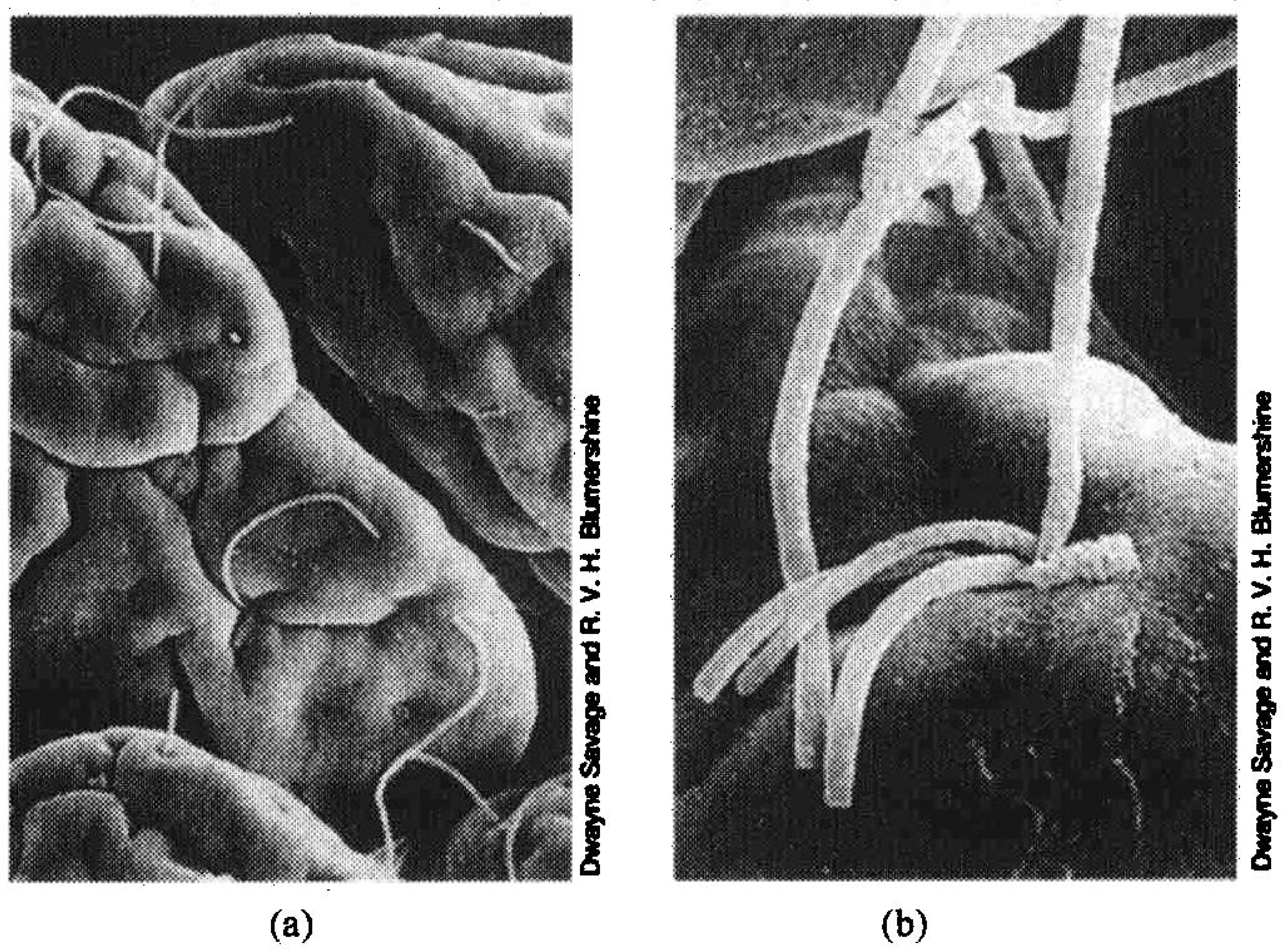


图 21.9　通过扫描电镜观察鼠回肠柱状上皮细胞表面的微生物群落。（a）低倍镜观察，需要注意回肠表面生长着长丝状、两端渐细的细菌。（b）高倍镜观察，可看到有几个细丝连接到一个凹陷处，注意连接只在细丝末端，单个细胞长 10～15μm。

terococcus faecalis）几乎总是以相当大的数目存在于大肠内。

肠道菌群的功能和产物

肠道菌推动了大量的关键代谢反应（表 21.2），形成一系列产物。肠道菌的组成和饮食习惯影响了代谢产物的组成和数量。

表 21.2 肠道微生物生化/代谢产物

维生素合成	产物：硫胺素、核黄素、维生素 B_6、维生素 B_{12}、维生素 K
气体产生	产物：二氧化碳、甲烷、氢气
气味产生	产物：硫化氢、氨气、胺、吲哚、铬酸
有机物产生	产物：乙酸、丙酸、丁酸
糖苷酶反应	酶：β-葡糖苷酸酶、β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、α-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶
类固醇代谢	过程：酯化作用、氧化作用、还原作用、置换作用

这些产物含有维生素 B_{12}和维生素 K。这些重要的维生素不能由人体产生，它们由肠道微生物菌落产生并被肠道吸收。类固醇由肝脏产生，以胆汁的形式由胆囊释放到肠道，在肠道经微生物菌落修饰而活化，活化的类固醇复合物仍从肠道吸收。

微生物发酵所产生的其他物质是一些在表 21.2 中所列出的有气味物质。这些气体产自发酵和产甲烷微生物的新陈代谢。人体每天从肠道排出的数百毫升气体中，有一半来自吸入空气中的 N_2。一些食物经由肠道中的发酵细菌代谢产生 H_2和 CO_2。超过 1/3 的人含有产甲烷微生物（见 13.4 节），它能将其他肠道微生物产生的 H_2和 CO_2转变为 CH_4（甲烷）。牛瘤胃中的产甲烷微生物能产生大量甲烷，多达全球总生成量的 1/4（见 19.10 节）。

在食物通过胃肠道的过程中，水可以从消化后的食物中代谢出来，消化物逐渐浓缩，转变为粪便。细菌重量约占这些渣滓物质的 1/2。生存在大肠肠腔中的微生物，会不断地被流动的物质冲替下来，如果需要细菌数目恒定，就必须用新生成的细菌代替损失掉的细菌。因此，大肠极像一种恒化器（见 6.9 节）。在人体，食物通过整个胃肠大约需 24h，在肠腔中细菌生长速度以每天 1～2 倍增长。

当口服抗生素时，抗生素像抑制病原菌一样也可以抑制正常微生物群落的生长，导致肠道抗生素敏感菌的丧失。没有了正常的微生物群落存在，某些机会微生物如耐抗生素的葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、变形菌属（*Proteus*）、艰难梭菌（*Clostridium difficile*）和白色念珠菌（*Candida albicans*）细菌就会占据大肠。一旦这些机会病原菌占据了肠道，就会对消化功能产生有害影响，甚至导致疾病产生。例如，抗生素疗法使敏感性差的微生物如艰难梭菌大量繁殖，导致感染，产生大肠炎。当抗生素疗法停止以后，最终正常微生物群落又会占据整个肠道，不过这个过程往往需要相当长的时间。

概念检查

胃呈极酸性，对许多微生物生长都是一个障碍。肠道呈微酸性到中性，有利于大量的不同种类的微生物群落在各种各样的营养条件和外部环境条件下生长。

◆ 为什么小肠比大肠更适于兼性厌氧菌的生长？

◆ 识别几种由肠道微生物产生的重要化合物。利用抗生素清除掉体内所有微生物会有什么后果？

21.5 身体其他部位的正常菌群

每一种黏膜都会有利于一类特殊的微生物种属的生长，这些微生物是正常生存环境的一部分，也是健康组织的特性。在许多情况下，有致病性潜能的微生物不能在黏膜表面生成菌落，是因为这些部位存在着正常微生物群落。在这一节中，我们讨论两种黏膜环境以及在这种环境中存在的微生物。

呼吸道

图 21.10 为呼吸道的解剖示意图（图 26.2）。在上呼吸道（upper respiratory tract）中（鼻咽、口腔及喉咙），微生物的主要生存处是分泌物覆盖的黏膜。在人体呼吸过程中，细菌从空气进入上呼吸道内，但在鼻孔道内，大部分微生物都会被捕捉而沉积下来，然后再随鼻黏膜分泌物被排出体外。进入下呼吸道的微生物大多是葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌以及革兰氏阴性球菌。金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、肺炎链球菌（*Streplococcus pneumoniae*）具有潜在的致病性。在健康人鼻道内，这些细菌是正常微生物群落的一部分（表 21.1）。这些病原菌的携带者一般不会患病，这是因为在这个部位生存的其他微生物能成功地与这些病原菌竞争营养物质，限制病原菌生长。这个部位的先天免疫系统（见 22.2 节和 23.1 节）和获得性免疫系统成分在黏膜表面具有更强的活性，这也可以抑制病原菌生长（见 22.9 节）。

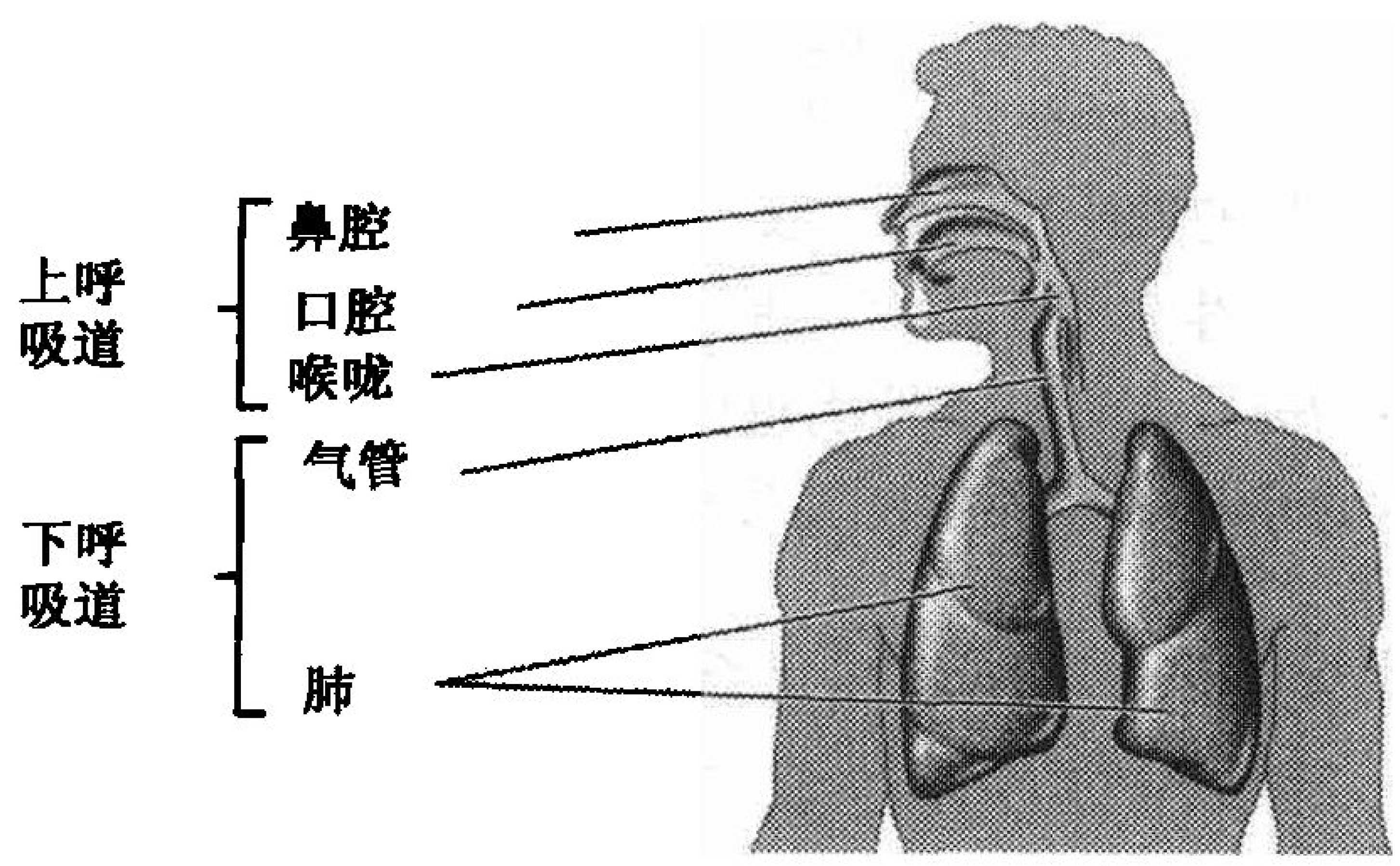


图 21.10　人体呼吸道示意图。上呼吸道密集着大量而且种类繁多的微生物，下呼吸道除非是遭受感染，否则极少有微生物菌落（图 26.2）。

下呼吸道（lower respiratory tract）（气管、支气管以及肺）实质上是无菌的，尽管在呼吸过程中会有大量微生物具备能力到达这个区域。在上呼吸道中，较大的灰尘颗粒会沉积下来。当空气进入下呼吸道时，空气的流速会显著降低，其中的微生物会沉积到呼吸道的管壁上。整个呼吸道上皮布满了纤毛，纤毛向上摆动，推动细菌和其他颗粒物质向上呼吸道移动，在那里通过唾液和鼻分泌物排泄掉。只有直径小于 10μm 的颗粒才能到达肺。

泌尿生殖道

在男性和女性的泌尿生殖道（urogenital tract）中（图 21.11a），膀胱自身通常是无菌的。但排列在尿道中的上皮细胞处经常有兼性好氧 G^- 杆菌和球菌形成的菌落（表 21.1）。这些微生物包括大肠杆菌、奇异变形菌（*Proteu mirabilis*）和其他细菌，这些微生物一般存在于人体或局部环境中。人体的某些变化（如局部 pH 改变）会允许微生物繁殖，并导致疾病。这些微生物经常能导致尿道感染，尤其是女性。

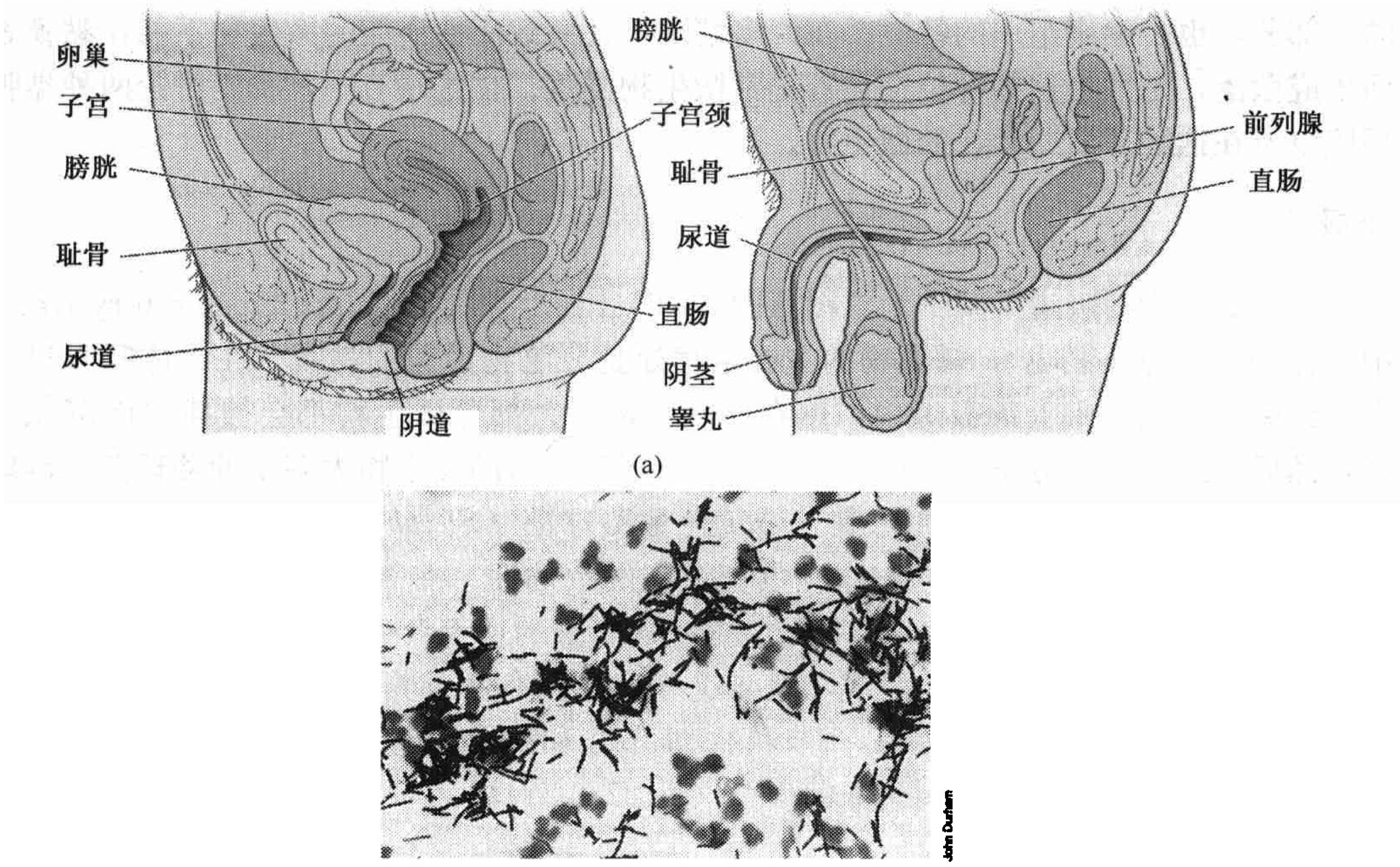


图 21.11　在泌尿生殖道中生长的微生物。(a) 女性和男性的泌尿生殖道，红色区域是微生物生长活跃的部位。无论男性女性，泌尿生殖道上部区域是无菌的。(b) 从青春期开始到绝经期结束，嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）一直是女性阴道内主要微生物，菌体长度 3～4μm。年幼和年长妇女的阴道由于酸性弱，栖息着多种在中性或碱性条件生长的微生物。

一般成熟女性的阴道呈微酸性，并且含有大量的多糖、糖原。嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）能发酵糖原产生乳酸，此细菌经常存在于阴道中，维持酸性环境（见 21.19 节和图 21.11b）。其他一些微生物——酵母菌、链球菌及大肠杆菌也可以存在。在青春期之前，女性阴道呈碱性，且不会产生糖原，没有嗜酸乳杆菌的存在。此时的微生物群落主要是葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌和大肠杆菌。更年期之后，糖原消失，pH 上升，微生物群落与青春期之前相同。

概念检查

在呼吸道和泌尿生殖道中，正常的非致病性的微生物群落的存在对器官发挥正常功能起着非常重要的作用，可以抑制病原菌生成菌落。

◆ 在上呼吸道中，有时可在正常的微生物群落中发现病原菌，为什么在这种情况下它们没有导致疾病？

◆ 为什么在正常的成年女性泌尿生殖道中会发现乳酸菌？在绝经后的妇女中却未发现？

Ⅱ 对人体有害的微生物

微生物的作用也可能对宿主有害并导致疾病。现在我们讨论微生物引发疾病的能力及发病机制。微生物致病始于其对宿主细胞的黏附，而后伴随着侵入、菌落生成和生长。不加控制的病原菌的生长会导致宿主受损。病原菌使用不同策略来获得毒力（virulence），即病原菌致病的相对能力（图 21.12）。现在我们依次说明与获得毒力相关的因素。

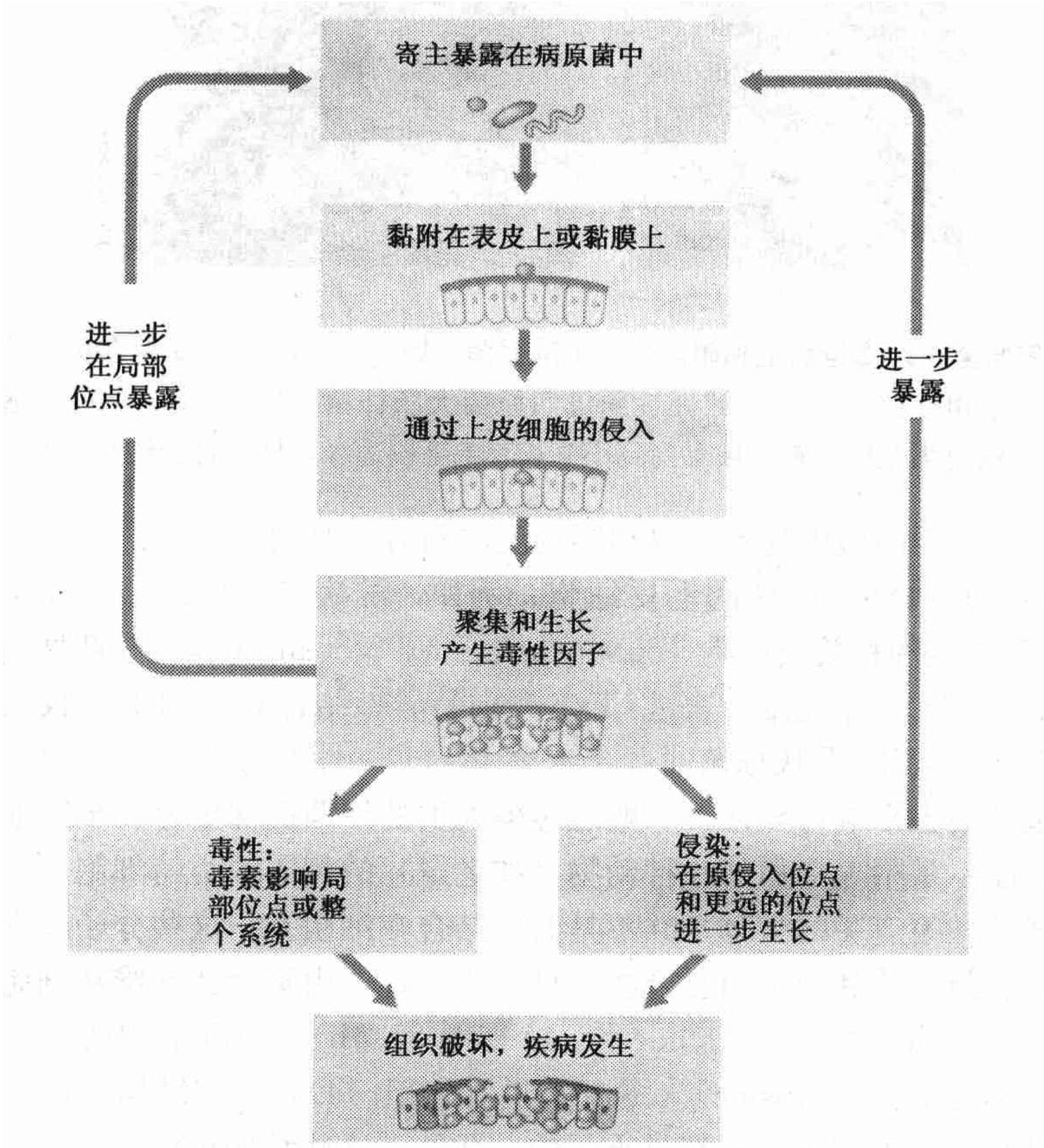


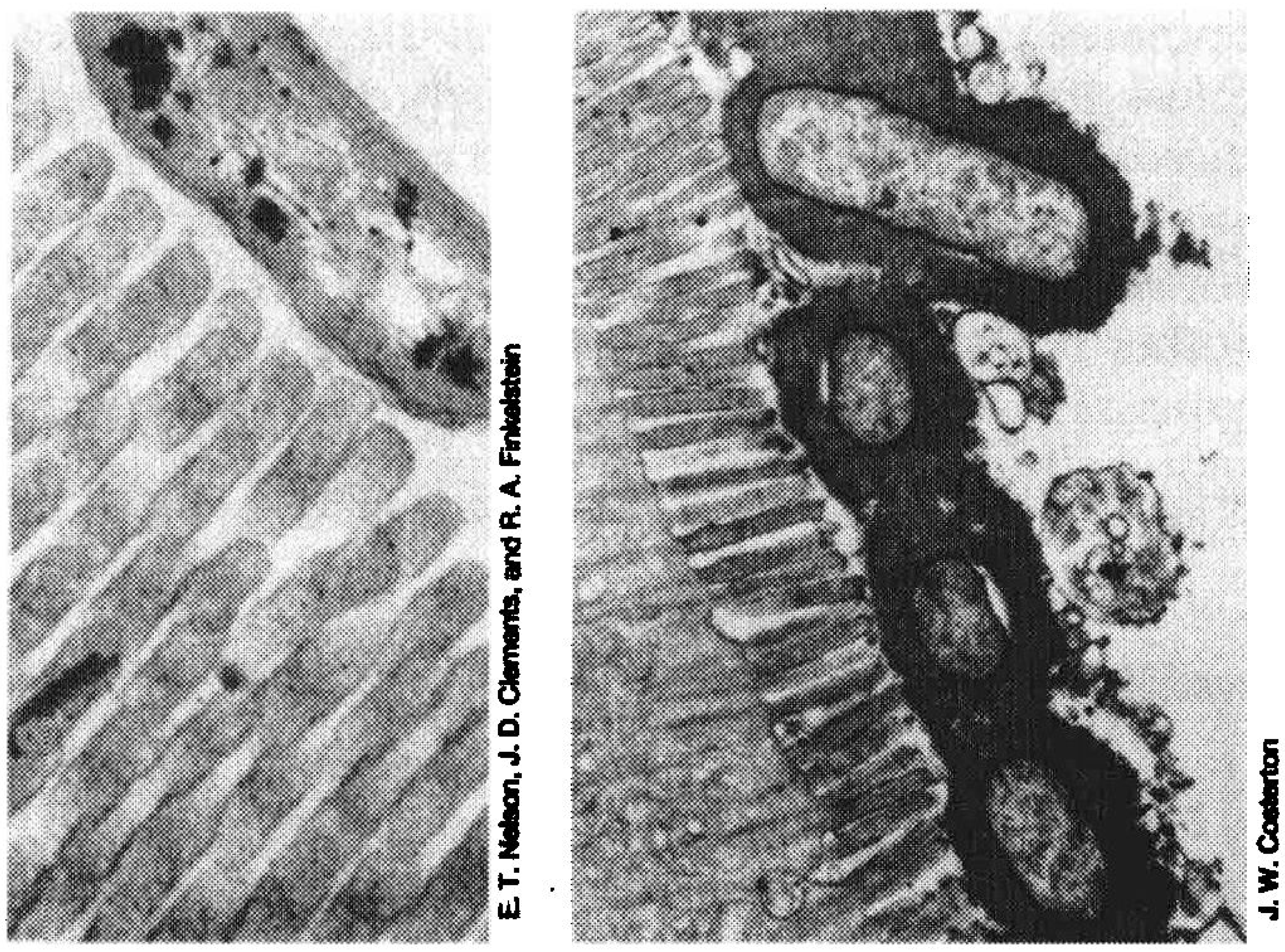
图 21.12　微生物与发病过程。微生物存在于宿主体内不一定导致疾病发生。

21.6 病原体侵入宿主

在对宿主造成损伤之前，病原菌一般必须能进入宿主组织内，并进行繁殖。在许多情况下，微生物需要穿透皮肤、黏膜、肠上皮以及其他在正常情况下能作为微生物入侵屏障的表面。

特异性附着

许多微生物都是从呼吸道、食道及尿道黏膜上开始感染的。细菌或病毒通过病原菌与宿主表面的大分子相互作用特异性地黏附上皮细胞从而引起感染（图 21.13）。



(a) (b)

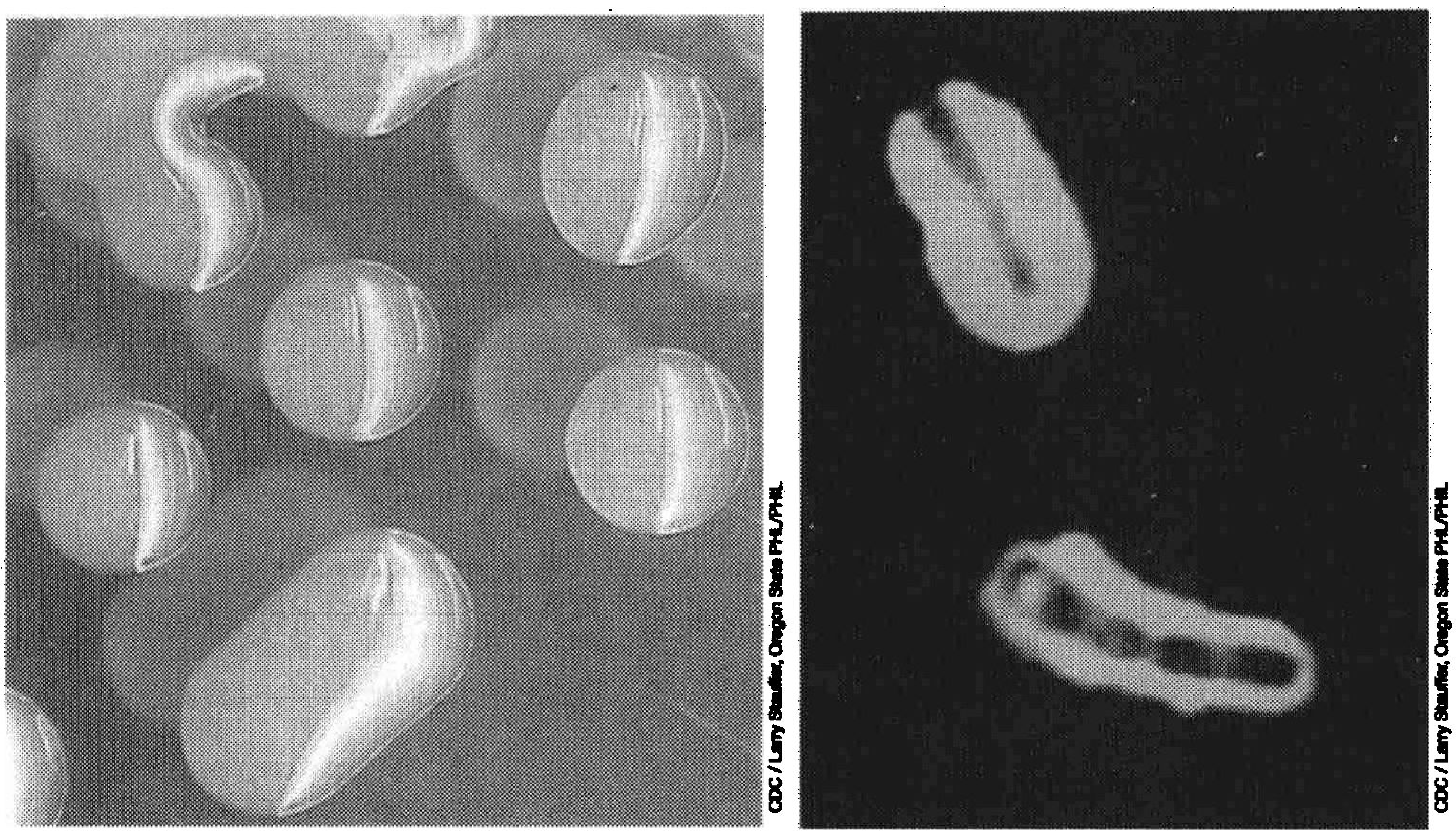
图 21.13 病原菌在动物组织上黏附。（a）霍乱弧菌（*Vibrio chderae*）黏附在兔长茸毛毛刷边缘超薄切片透射电镜照片。（b）致死性肠道病原菌大肠杆菌（*Escherichia coli*）感染新生小牛，细菌细胞通过大范围多糖外膜黏附到小牛长茸毛毛刷边缘，杆状直径约 0.5μm。

一个具备感染性的微生物不会以相同程度的附着力黏附所有的上皮细胞，但可以有选择地附着身体某些特殊区域的上皮细胞。例如，淋病奈瑟氏球菌（*neisseria gonorrhoeae*）通过称作混浊相关蛋白质（opacity associated protein，Opa）在两性间传播淋病致病因子（见 26.12 节），宿主细胞通过 CD66 蛋白特异性结合 Opa。CD66 仅发现于人上皮细胞表面。这样，淋病奈瑟氏球菌通过受体-配体对专一性地与靶细胞相互作用。

宿主细胞种类也影响特异性。一般能感染人类的细菌菌株更容易牢固地黏附在人体某些细胞上，而不是附着在另外一种动物（如老鼠）的相同种类的细胞上，反之亦然。

一些与细菌黏附有关的大分子并不是共价结合在细菌上。这些分子通常是细菌合成和分泌的多糖、蛋白质和糖蛋白复合物（见 4.10 节）。由聚合体纤维从细胞向外延伸构成的松散网状结构称为黏液层（slime layer）（图 21.4b）。包围细胞的一层浓厚、明晰的多聚体外套称为荚膜（capsule）（图 21.13 和图 21.14），这些结构不仅对黏附宿主组织，而且对其与其他细菌间作用都是重要的。此外，这些结构可保护细菌免受宿主防御机制如吞噬作用的损害（见 22.2 节）。

菌毛（fimbriae）和性毛（pili）（见 4.10 节）是细菌细胞表面蛋白质结构，在黏附过程中也发挥作用。例如，淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）的性毛在菌体黏附到泌尿生殖器上皮的过程中起到关键的作用，有菌毛的大肠杆菌（图 21.15）比那些无菌毛的菌株更容易致使尿道感染。在众多菌毛中，存在于肠道细胞上的 Ⅰ 型菌毛（type Ⅰ fimbriae）研究最为透彻，这类细菌包括埃希氏菌属（*Escherichia*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）细菌、志贺氏菌属（*Shigella*）细菌。Ⅰ



(a)　　　　　　　　　　　　(b)

图 21.14　炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）荚膜。（a）炭疽芽孢杆菌荚膜在碳酸盐琼脂培养基上的形态，有荚膜菌落大，直径约 0.5cm，呈现典型黏液状。（b）直接对炭疽芽孢杆菌荚膜免疫荧光染色，抗体交联有荧光素（FITC）能够把荚膜染绿，发现荚膜伸出细胞约 1μm，直径 0.5μm。有关炭疽芽孢杆菌更多介绍及其在生物武器方面的应用将在 25.12 节和 25.13 节介绍。

型菌毛是唯一分布在细胞表面的菌毛。性毛一般长于菌毛，但数量较少。菌毛和性毛都通过结合宿主细胞糖蛋白发挥功能，参与黏附过程。鞭毛（见 4.14 节）同样能增加对宿主细胞的附着从而增强毒性（图 21.17）。

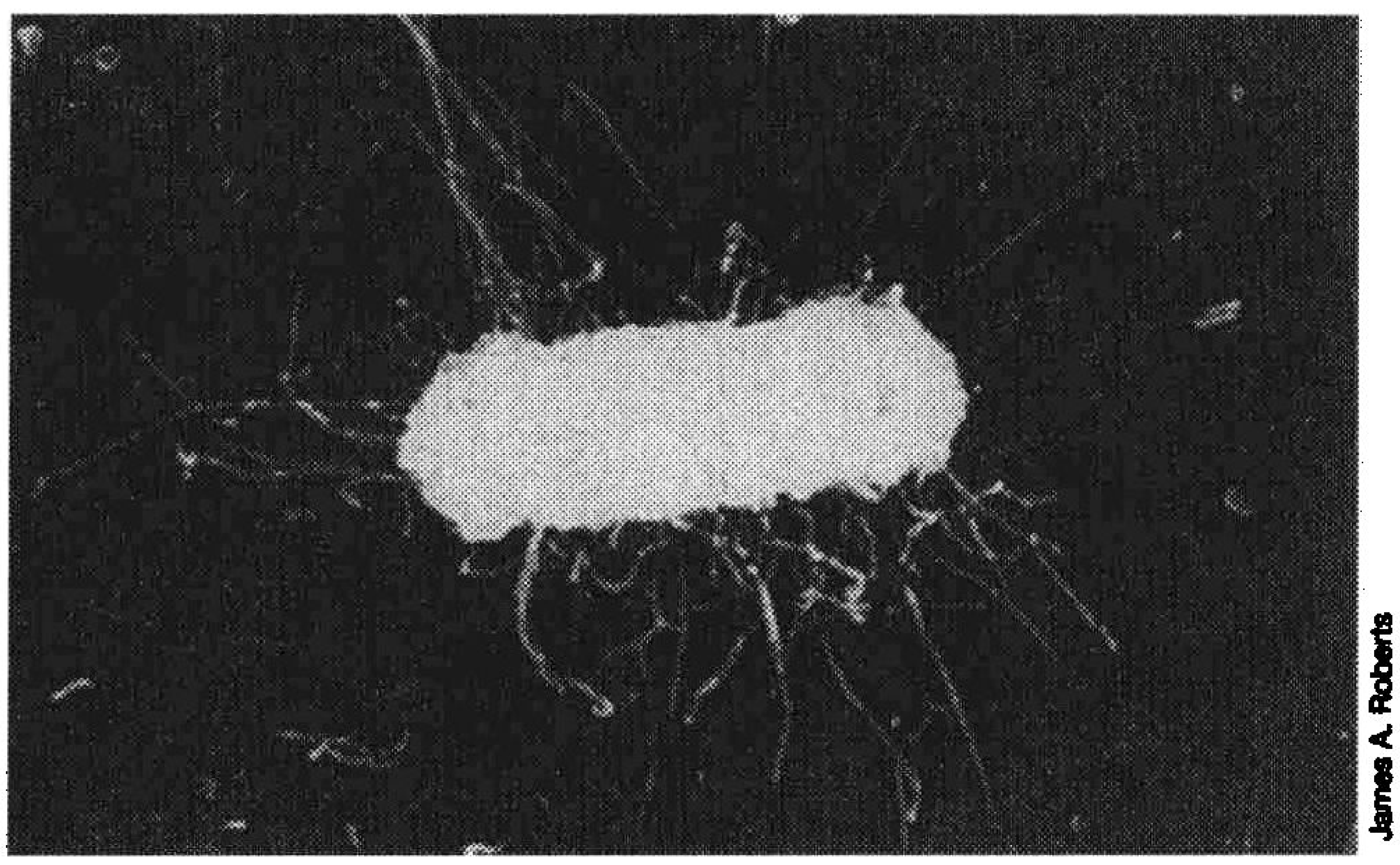


图 21.15　大肠杆菌（*Escherichia coli*）负染的电子显微镜照片。图中显示大肠杆菌 P 型菌毛与 I 型菌毛类似，但较之稍长，图示细胞宽度为 0.5μm。

对大肠杆菌引起腹泻的研究可以证明黏膜上皮与病原菌之间具有特异性的相互作用。大多数大肠杆菌菌株是非肠道致病性的，栖息在盲肠和结肠（图 21.8），是正常菌群的一部分。大肠杆菌的多个菌株通常同时出现在体内，单纯通过人体，以粪便的形式

排出，而由大肠杆菌产肠毒素菌株（enterotoxic strains）表达的菌毛蛋白 CFA（colonization factor antigens，建群因子抗原），可以特异性吸附小肠细胞。此后，它们便繁殖并产生肠毒素（见 21.11 节），导致腹泻和其他疾病（见 29.8 节）。大肠杆菌非致病性菌株很少具有 CFA 蛋白。表 21.3 总结了在微生物黏着过程中几种主要因子。

表 21.3 微生物病原菌纤毛黏附宿主组织所利用的主要黏附因子*

黏附因子	举例
荚膜/黏液层（见 4.10 节，图 21.4、图 21.3、图 21.14）	致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*)：荚膜有助于吸附消化道纤毛边缘毛刷 变异链球菌(*Streptococcus mutans*)：右旋糖黏层帮助结合到牙齿表面
黏着蛋白	酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus pyogenes*)：细菌 M 蛋白结合呼吸道黏膜受体 淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)：Opa 蛋白结合泌尿生殖系统上皮细胞
脂磷壁酸(见 4.8 节和图 4.31)	酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus pyogenes*)：与 M 蛋白协同结合呼吸道黏膜
菌毛(性毛)(见 4.10 节和图 21.15)	淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)：性毛有助于结合在泌尿生殖道 沙门氏菌属(*Salmonella*)菌种：I 型菌毛帮助结合小肠上皮 致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*)：菌落因子抗原(CFA)结合小肠上皮

* 宿主组织上的许多受体位点是糖蛋白或复杂的脂质，如神经节苷脂或红细胞糖苷脂。

侵入

有少数微生物仅仅是由于它们产生毒素而致病。这些微生物无需进入宿主组织中，我们将对它们分别进行讨论（见 21.10 节和 21.11 节）。然而许多病原菌穿透上皮以后才能引发致病性，这个过程称为侵入。病原菌侵入的部位一般是在皮肤上小的破损处、损伤处或在黏膜表面。一般菌体会在黏膜下生长，但是如果改变或消除了正常的微生物群落如抗菌化学疗法后，病原体也可以在接触的黏膜表面生长，而后病原菌就会很容易地在黏膜处生成菌落，并启动侵入过程。病原菌也可以在远离原来侵入点的部位生成菌落，菌体通过血液或淋巴循环系统，可以到达体内较远位点。

概念检查

病原菌可以首先通过与宿主大分子的相互作用黏附到黏膜表面，从而进入宿主组织。侵入既可以在黏着位点开始也可以通过循环系统在宿主体内蔓延。

- ◆ 大肠杆菌的 CFA 分子及奈瑟氏淋球菌的 Opa 蛋白是如何影响黏附到黏膜组织？
- ◆ 吸附怎样启动侵入？

21.7 定居和生长

如果病原菌进入组织，它必须进行繁殖，这个过程称为建群或定居（coloniza-

tion)。因为如果病原体要进行生长，它必须能够在宿主体内找到合适的营养和环境条件，温度、pH 和氧的存在与否等都是影响病原菌生长的环境因素，但能在宿主体内获得微生物营养物是最为必要的。

对微生物而言，虽然脊椎动物宿主看起来像一个营养物的天堂，但在宿主体内并非所有营养条件都能满足。水溶性营养物，如单糖、氨基酸、有机酸会经常处于短缺状态，但能够提供微生物可利用的复杂营养物质资源（如糖原）。并非所有组织在任何时候，都能足够地提供所有维生素和生长因子。例如，流产布鲁氏杆菌（*Brucella abortus*）感染家禽体内所有组织都生长非常缓慢，但在胎盘中却能迅速生长，以至导致流产。这种组织特异性是由于在胎盘内赤藓糖醇的浓度高，很大程度刺激了流产布鲁氏菌的生长（表 21.6）。

微量元素的缺失也可以影响病原菌的产生。例如，铁会对微生物生长产生影响（见 5.1 节）。在动物体内存在特殊蛋白质，被称为是转铁蛋白（transferrin）和乳铁传递蛋白（lactoferrin），这两种蛋白质都可以牢固的与铁结合，并在体内转运铁。因为这些蛋白质对铁具有一定的亲和力，致使微生物普遍缺铁。实际上，给一个感染的动物体补充水溶性铁盐，会在很大程度上提高了一些病原菌的毒力。

就如我们在 5.1 节中注意到的那样，许多细菌都能产生铁螯合物（siderophore；铁载体），它可以有助于微生物从环境中获得铁。从某些病原菌中分离到的一些铁螯合物能有效地从动物体的铁结合蛋白中移出铁离子。例如，被称为 aerobactin 的铁载体由大肠杆菌某些特定菌株产生的，由 *Col V* 质粒（见 10.9 节）编码，它可以很容易地移出与运铁蛋白结合的铁离子。再如，奈瑟氏球菌会产生运铁蛋白特异性受体，能结合运铁蛋白上的铁离子。

体内定位

当病原菌进入宿主体内，微生物经常集中在一个区域繁殖，产生一个小感染位点。例如，长疱通常是由于葡萄球菌（*Staphylococcus*）感染皮肤造成的。另一方面，微生物也可以通过淋巴器官沉积到淋巴结上。如果微生物到达血液，它将分布到身体更远的部位，通常会在肝或脾脏内聚集。通过血液和淋巴系统蔓延的病原菌会在许多组织上生长。如果在组织内出现细菌大范围生长，一般就会有大量微生物进入血液中，这个状态就称为菌血症（bacteremia）。这种遍及性感染几乎总是由某一特定器官感染引起的，如肾脏、肠或肺。

概念检查

如果病原体要进行生长，它必须能够在宿主体内找到合适的营养和环境条件。微生物可能在侵入位点生长，也可能扩散到全身。

- 为什么繁殖和生长对大多数病原菌的成功是必需的？
- 哪些宿主因素限制或促进微生物在局部位点的繁殖和生长？

21.8 毒力

毒力（virulence）指寄生生物导致疾病的能力。在此探讨一些测定毒力的基本方法。接着，本节将涉及几种具有特殊毒力的微生物，并特别指出其增强毒力的策略。

毒力测量

通过实验研究 LD_{50}（半数致死量），可以估测病原菌的毒力，所谓半数致死量是指在实验组中，一种因素杀死 50%的动物的剂量。毒力强的病原菌杀死 100%群体和杀死 50%群体所需病原菌细胞数几乎没有什么差别。图 21.16 显示链球菌（*Streptococcus*）和沙门氏菌（*Salmonella*）感染老鼠的实验。肺炎链球菌（*Strptococcus pneumoniae*）只需少许几个菌体就可以对鼠造成致死感染，因而一旦确定了一株特殊菌株具有毒力，几乎所有实验个体均被杀死。实际上，这个病原菌的 LD_{50}很难确定，因为造成致死感染只需很少量的几个微生物。相比之下，鼠伤寒沙门氏菌也是一种老鼠的病原菌，但毒力要弱得多，同时它的 LD_{50}也比肺炎链球菌的 LD_{50}要高得多，杀死 100%群体所需的病原菌细胞数目要比 LD_{50}高得多。

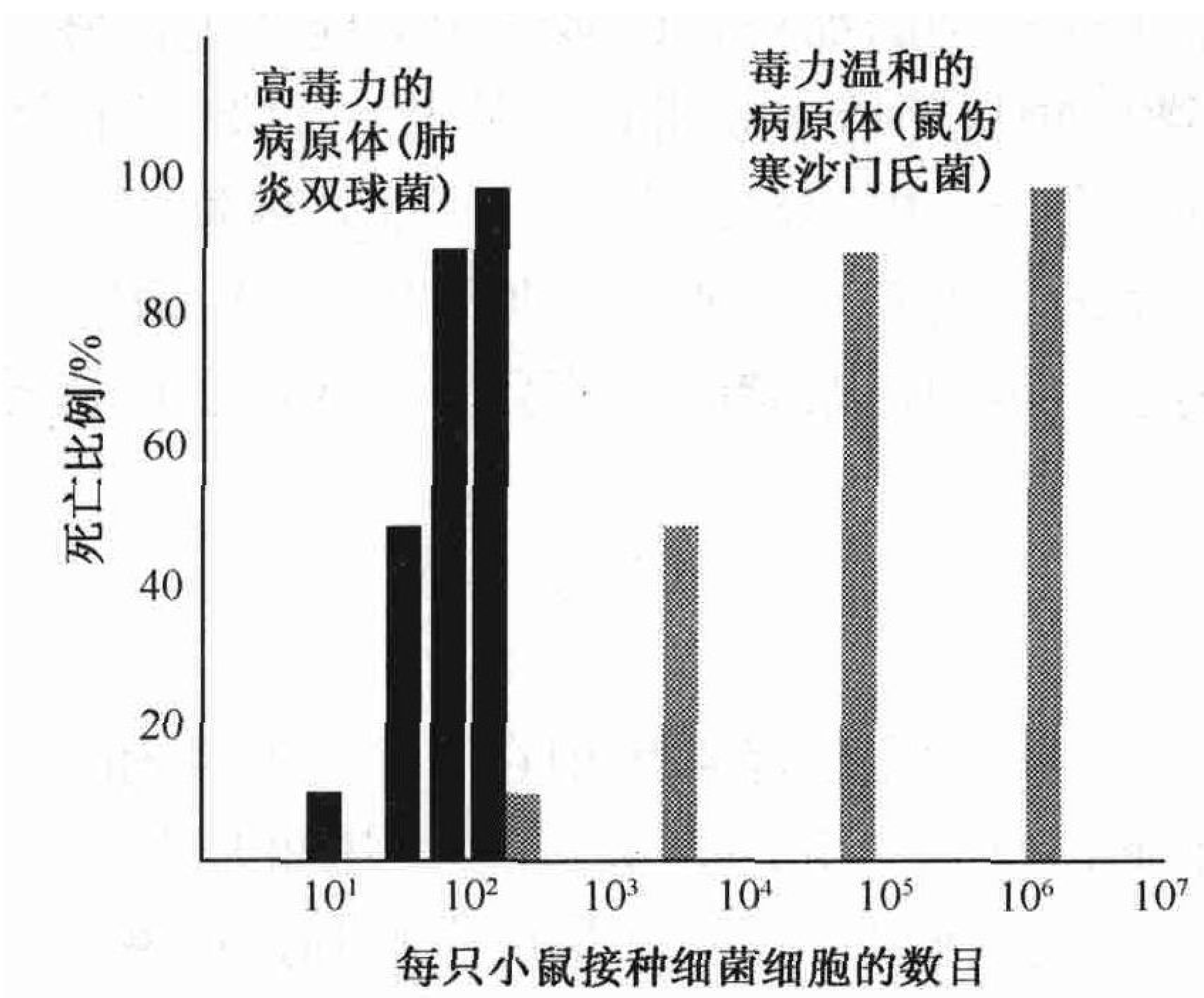


图 21.16 微生物毒力。 通过鼠致死剂量，比较肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）和鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）的毒力。

当病原体在实验室保存很长时间而没有进入动物体时，它们毒力经常会降低，甚至完全消失，这种微生物称为减毒微生物。由于非毒性的突变株生长较快，通过连续不断地接入新鲜培养基，可以有选择地得到突变株。当培养条件不适合这个属时，经常也会很容易的出现减毒作用。如果把减毒的培养液重新接入动物体，有时会重新分离出毒性微生物，但在大多情况下毒株将永久失去了毒性。减毒株经常用于疫苗的生产，尤其是病毒疫苗（见 22.13 节），如麻疹、腮腺炎和风疹的疫苗均由减毒的病毒制备。

毒性和侵袭力

毒力是病原体通过毒性和侵袭力引起宿主损伤的能力。所有病原体都利用这种性质引起疾病。毒性（toxicity）是生物体通过释放毒素来抑制细胞功能或杀死细胞而引发

疾病的能力。例如，破伤风是由破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）产生的有效外毒素引起的（见 21.10 节）。破伤风梭菌很少离开其最初感染的伤处，并会在受伤部位缓慢生长。但是破伤风梭菌却能导致疾病，这是因为它能产生破伤风毒素，并将毒素运送到身体远端，引起瘫痪，并经常致宿主死亡。

侵袭力（invasiveness）是生物体在宿主组织大量生长以至于病原菌抑制宿主功能的能力。一种微生物即使不产生任何毒素也能通过侵袭力引起疾病。例如，肺炎链球菌（*Strptococcus pneumoniae*）的主要毒力因子是多糖荚膜，它能阻止宿主对致病菌株的吞噬（见 21.6 节、26.2 节和 26.3 节），破坏宿主阻止入侵的主要防御机制。有荚膜的肺炎链球菌菌株能引起广泛的宿主损害，这是因为它们的高侵袭力，它们在肺组织中大量生长，引发宿主反应导致肺炎（见 26.2 节）。无荚膜的菌株会很快并有效地被俘获并被噬菌作用摧毁。

破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）和肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）例证了毒性和侵袭力的两个极端。许多病原菌介于这两种情况之间，同时采用两种方式致病。

沙门氏菌属细菌的毒力

沙门氏菌属（*Salmonella*）细菌利用毒素、侵袭力和其他毒力因子来增强致病性（图 21.17）。首先，有几种毒素与沙门氏菌有关，其产生至少 3 种毒素，肠毒素（enterotoxin）（表 21.4）、内毒素（endotoxin）（见 4.9 节，图 4.35）和细胞毒素（cytotox-

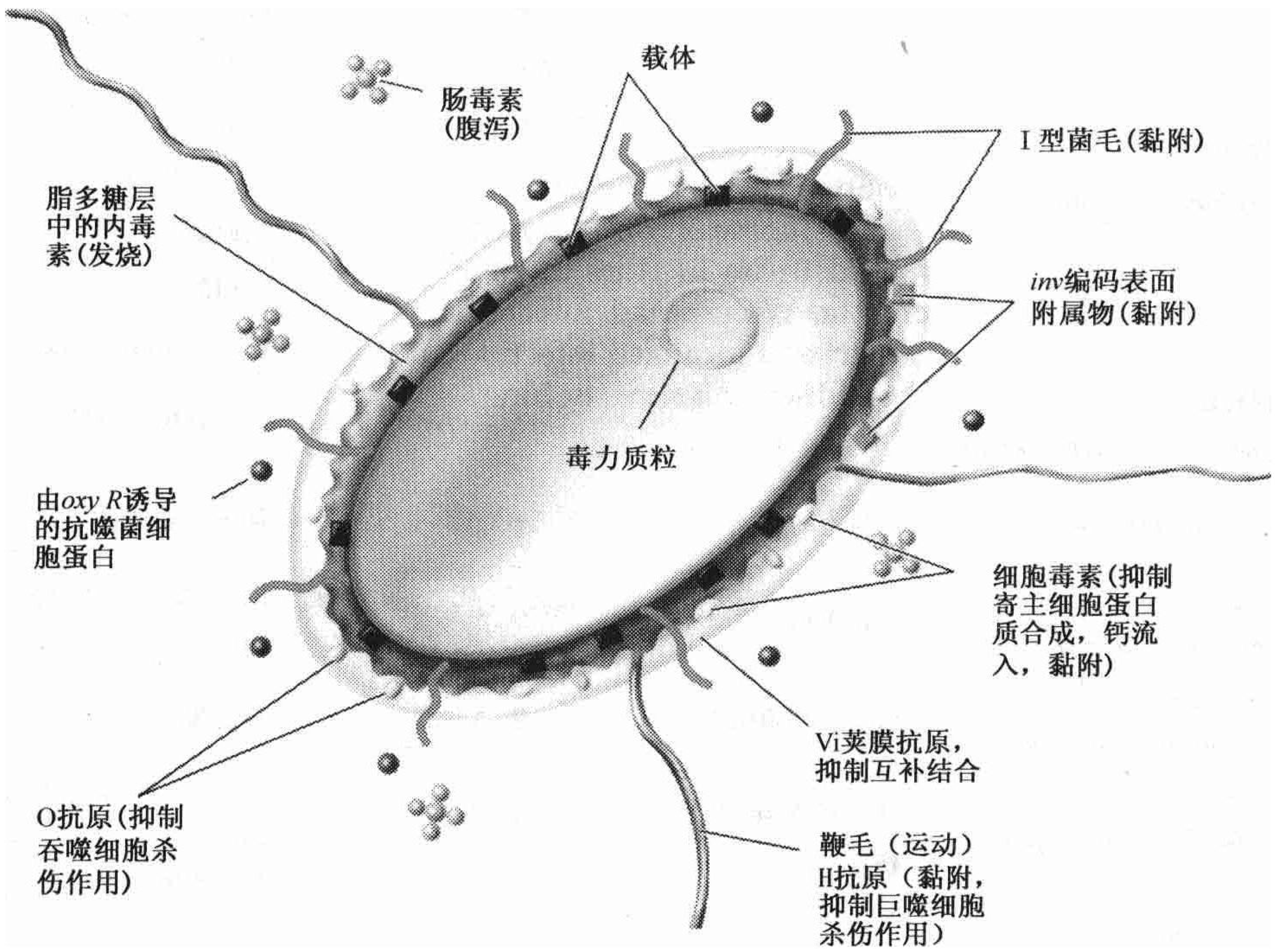


图 21.17　沙门氏菌（*Salmonella*）致病的毒力因子。图中列出沙门氏菌致病的重要结构。*pho* 基因系统的蛋白质产物尚不清楚，但知其作用是中和巨噬细胞的防御效应。

in)。细胞毒素通过抑制宿主细胞蛋白质合成与释放 Ca^{2+} 到宿主胞外发挥作用。许多毒力因子与沙门氏菌的侵袭力有关。细胞表面的多糖、O 抗原（图 4.35）、鞭毛 H 抗原和菌毛都增强黏附性。荚膜 Vi 多糖抑制补体结合和抗体介导的杀伤作用。沙门氏菌侵袭力基因编码至少 10 种蛋白质，其中包括侵入蛋白。例如，*invH* 编码一类表面吸附蛋白，而 *invC*、*invG*、*invJ* 编码用于与宿主细胞结合的特殊表面附加物（surface appendage）的装配蛋白。

表 21.4 由特定有害病原菌产生的外毒素和细胞外毒力因子

病原体	疾病	毒素或因子	作用
炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）	炭疽热	致死因子（LF）、水肿因子（EF）、保护性抗原（PA）	PA 是结合细胞的 B 组分，EF 引起水肿，LF 导致死亡
蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）	食物中毒	肠毒素复合物	使肠细胞脱水
百日咳博特化杆菌（*Bordetella ertussis*）	咳嗽	百日咳毒素（AB）	阻碍 G 蛋白信号转导，杀死细胞
肉瘤梭菌（*Clostridium botulinum*）	肉毒	神经毒素（AB）	无力瘫痪（图 21.20）
破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）	破伤风	神经毒素（AB）	痉挛瘫痪（图 21.21）
产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）	起泡坏疽，食物中毒	α-毒素（CT）	溶血（卵磷脂酶）
		β-毒素（CT）	溶血
		γ-毒素（CT）	溶血
		δ-毒素（CT）	溶血（强心剂）
		κ-毒素（E）	胶原酶
		λ-毒素（E）	蛋白酶
		肠毒素（CT）	使肠上皮渗透性改变
白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheria*）	白喉	白喉毒素（AB）	抑制真核细胞蛋白质合成
大肠杆菌（*Escherichia coli*）	肠胃炎	肠毒素（AB）	使肠细胞脱水
杜氏嗜血菌（*Haemophilus ducreyi*）	软性下疳	细胞致死扩张毒素（CDT）（AB）	DNA 损伤诱导宿主细胞凋亡
铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）	假单胞杆菌感染	外毒素 A（AB）	抑制蛋白质合成
沙门氏菌（*Salmonella* sp.）	沙门氏菌病、伤寒、副伤寒	内毒素（AB） 细胞毒素（CT）	抑制蛋白质合成裂解宿主细胞 使肠细胞脱水
痢疾志贺氏菌（*Shigella dysenteriae*）	细菌性痢疾	志贺氏毒素（AB）	抑制蛋白质合成

续表

病原体	疾病	毒素或因子	作用
金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）	化脓感染、呼吸道感染、食物中毒、素毒性休克综合征、皮肤烫伤综合征	α-毒素（CT）	溶血
		致休克毒素（SA）	全身休克
		脱落毒素 A、B（SA）	皮肤脱休克
		杀白细胞毒素（CT）	破坏白细胞
		β-毒素（CT）	溶血
		γ-毒素（CT）	杀死细胞
		δ-素毒（CT）	溶血，白细胞溶解
		肠毒素 A、B、C、D 和 E（SA）	呕吐、痢疾、休克
		凝固酶（E）	血纤维凝块
酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）	化脓感染、扁桃腺炎、猩红热	链球菌溶血素 O（CT）	
		链球菌溶血素 S（CT）	溶血素
		产红细胞毒素（SA）	溶血素（图 21.18a）
		链球菌激酶（E）	导致猩红热皮疹
			溶解血纤维凝块
		透明质酸酶（E）	溶解交联组织中的透明质酸
霍乱弧菌（*Vibrio chderae*）	霍乱	肠毒素（AB）	使肠细胞脱水（图 21.22）

沙门氏菌通过寄生容易建立感染，能在小肠细胞和巨噬细胞中生长，甚至能在正常条件下杀死细菌的血液白细胞中生长（见 22.2 节）。巨噬细胞产生的有毒氧化产物可被沙门氏菌 *oxyR* 基因诱导产生的蛋白质抑制。而巨噬细胞产生的抑菌分子防御素（defensins）却被 *phoQ* 和 *phoP* 基因产物抑制。这样，沙门氏菌 *oxy* 与 *pho* 基因产物可以通过侵入胞内，抑制正常条件下限制胞内细菌生长的宿主防御机制，以此增强致病性。

来源于多种质粒的毒力因子也参与多数沙门氏菌菌株的持续存在和传播。例如，质粒编码产生的抗生素抗性。沙门氏菌也产生铁载体（siderophores），一种细菌铁螯合蛋白（见 5.1 节与 21.7 节）。沙门氏菌及大多其他致病菌，利用多种因子建立毒力，引发疾病。这些毒力因子在肠道细菌的不同成员间进行传播（见 12.11 节）。

概念检查

毒力由病原菌的侵袭力、毒性及其他因素决定。在许多病原菌中，很多因素都有助于毒力的提高。减毒作用是毒力的丧失。沙门氏菌显示了其多种特性来增强毒力。

◆ 区分毒性和侵袭力。举例说明专门依赖毒性或侵袭力来增强毒力。

◆ 解释生物体如何减毒。讨论减毒微生物在疫苗制造方面所起的作用。

Ⅲ 毒力因子和毒素

胞外毒力因子和微生物产生的毒素加速疾病发生。许多此类蛋白质由不同病原菌生成，却彼此分享分子特性与行为模式。在此，从研究具有代表性的毒力因子和毒素来窥测其普遍机制。

21.9 毒力因子

我们称病原菌产生的用于建立和维持疾病的胞外蛋白质为毒力因子（virulence factor）。大多数毒力因子属于酶类，其能促进病原菌的繁殖与生长。例如，链球菌属、葡萄球菌属及某些梭状芽孢杆菌可产生透明质酸酶（hyaluronidase）（表 21.4），此酶可通过分解透明质酸而促进微生物在组织内的蔓延。透明质酸是一种多糖，在身体内起着一种组织内融合剂的作用。透明质酸酶可以消化胞内基质使得微生物从起始感染位点向内部蔓延。链球菌属和葡萄球菌属也可以产生大量的蛋白质水解酶、核酸酶和脂肪酶，这些酶可以分别使宿主蛋白质、核酸和脂肪解聚。产生毒性坏疽的梭状芽孢杆菌也可产生胶原酶或 κ 毒素（κ -toxin）（表 21.4）。毒素可断裂支持组织网状结构的胶原组织，致使微生物在身体中扩散。

血纤维凝块和毒力

宿主经常在微生物侵入部位形成血纤维蛋白凝块。由组织损伤引发的凝血机制，隔离病原菌，将感染限制在局部区域。有些微生物能产生溶解血纤维蛋白的酶，此酶能分解这些凝块，使微生物有可能更深地侵入。这种由酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）产生的溶解血纤维蛋白的物质，即为众所周知的链激酶（streptokinase）（表 21.4）。

另一方面，一些微生物实际上可以产生促进血纤维蛋白凝集成块的酶，此酶可以使微生物停留在局部位置，不至于使微生物蔓延。研究最多的血纤维蛋白凝块酶是凝固酶（coagulase）（表 21.4），此酶由病原菌金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）产生。凝固酶可以使血纤维蛋白原料沉淀在球菌上，并能使它们免受宿主细胞的攻击。凝固酶作用的结果产生了血纤维蛋白基体。这种血纤维蛋白基体使许多由葡萄球菌的感染限定在局部位置生成小泡和疙瘩（图 26.21）。凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌被认为比凝固酶阴性菌株有更强的毒性。

概念检查

病原菌通过产生一系列酶来增强毒力，这些酶可以破坏或改变宿主组织来为病原菌自身提供通路和营养。其他病原菌产生的毒力因子通过干扰宿主正常防御机制为病原菌提供保护。这些因子促进病原菌的繁殖和生长。

◆ 病原菌通过产生酶消化宿主组织结构组分会获得什么优势？

◆ 凝固酶如何发挥作用来增强金黄色葡萄球菌的生长？

21.10 外毒素

当微生物生长时，把毒素释放到细胞外称为外毒素（exotoxin）。这些毒素也可以从感染集中位点向身体较远的部位扩散，造成损伤的区域也远离微生物生长的位点。表 21.4 总结出了一些众所周知的外毒素和其他胞外毒力因子的特性与作用。

大多数外毒素不外乎 3 种类型：溶细胞毒素（cytolytic toxin）、A-B 毒素（A-B toxin）和超抗原毒素（superantigen toxin）。溶细胞毒素通过酶消化的方式攻击细胞组分而发挥作用。A-B 毒素包括两个共价作用的亚基，A 亚基和 B 亚基。B 亚基通常会结合细胞表面受体，让 A 亚基穿过靶细胞膜，并在此发挥破坏细胞的功能。超抗原通过刺激大量免疫应答细胞，导致炎症反应（见 22.16 节）。

溶细胞毒素

不同病原菌会产生破坏细胞质膜的蛋白质，即溶细胞毒素（cytolytic toxin），导致细胞溶解和死亡。因为利用血液红细胞（红细胞），可以容易地检测到这些毒素的活性，也称这些毒素为溶血素（hemolysin）（表 21.4）。但是，除红细胞外，病原菌也作用于其他细胞。通过血液琼脂平板划线（blood agar plate）实验，可以验证溶血产物。菌落生长期间，释放溶血素，裂解周围的血液红细胞，产生一个特殊的溶血圈（图 21.18a）。

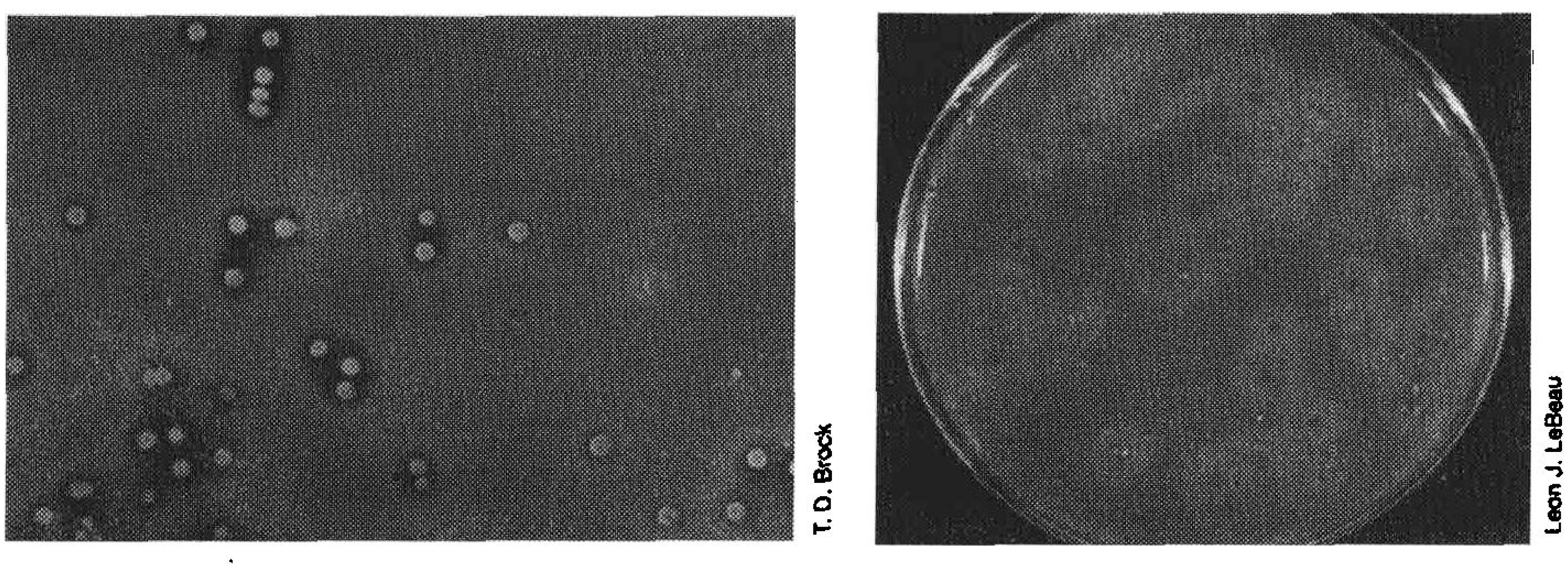


图 21.18　溶血。（a）生长在血琼脂平板上的酿脓链球菌（*Staphylococcus pyogenes*）菌落周围的溶血现象。（b）一种称为卵磷脂酵素的磷脂酶，出现在产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*），琼脂培养基中含有卵黄提供卵磷脂。卵磷脂酶使红细胞细胞膜溶解，呈现出溶血后清亮的区域。

一些溶血毒素攻击宿主细胞质膜的磷脂。因为卵磷脂磷脂通常是酶作用底物，所以这些酶也被称为卵磷脂酶（lecithinase）或磷脂酶（phospholipase）。例如，产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）的 α-毒素，它是一种溶解膜脂类的卵磷脂酶，会导致细胞裂解（图 21.18b）（表 21.4）。因为所有有机体的细胞质膜均含有磷脂，磷脂酶有时会将细菌和动物细胞质膜一起破坏。

然而一些溶血素却并非磷脂酶。一种由链球菌产生的溶血素——链球菌溶血素 O，

却影响宿主细胞膜的固醇类物质。杀白细胞素（leukocidin）（表 21.4）是可以裂解白细胞的细胞溶解酶，可降低宿主抵抗力（见 22.2 节）。

白喉毒素

白喉毒素（diphtheria toxin）是由白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheria*）所产生的毒素，是导致白喉产生的致病因子（见 26.3 节）。老鼠和田鼠对白喉毒素会有相对的抵抗性，人、兔子、豚鼠和鸟类对这些毒素都是敏感的，杀死单个细胞只需 1 个分子。白喉毒素是由白喉棒状杆菌产生的一类 A-B 毒素，主要成分是多肽。片段 B 能促进毒素与宿主特异性吸附（图 21.19）。然后片段 A 和 B 断裂，以助于片段 A 进入细胞质。片段 A 能阻断氨基酸从 tRNA 分子转移到延长的肽链上（见 7.15 节），从而干扰蛋白质的合成。这种毒素能特异性地致使多肽链延伸的一个延伸因子失去活性（延伸因子 2），通过催化 NAD^+ 中 ADP 部分连接到延伸的蛋白质上，在这个延伸的蛋白质的单个氨基酸残基位点被 ADP 核糖基化。随着 ADP 核糖基化，延伸因子 2 的活性急剧下降，蛋白质合成终止。

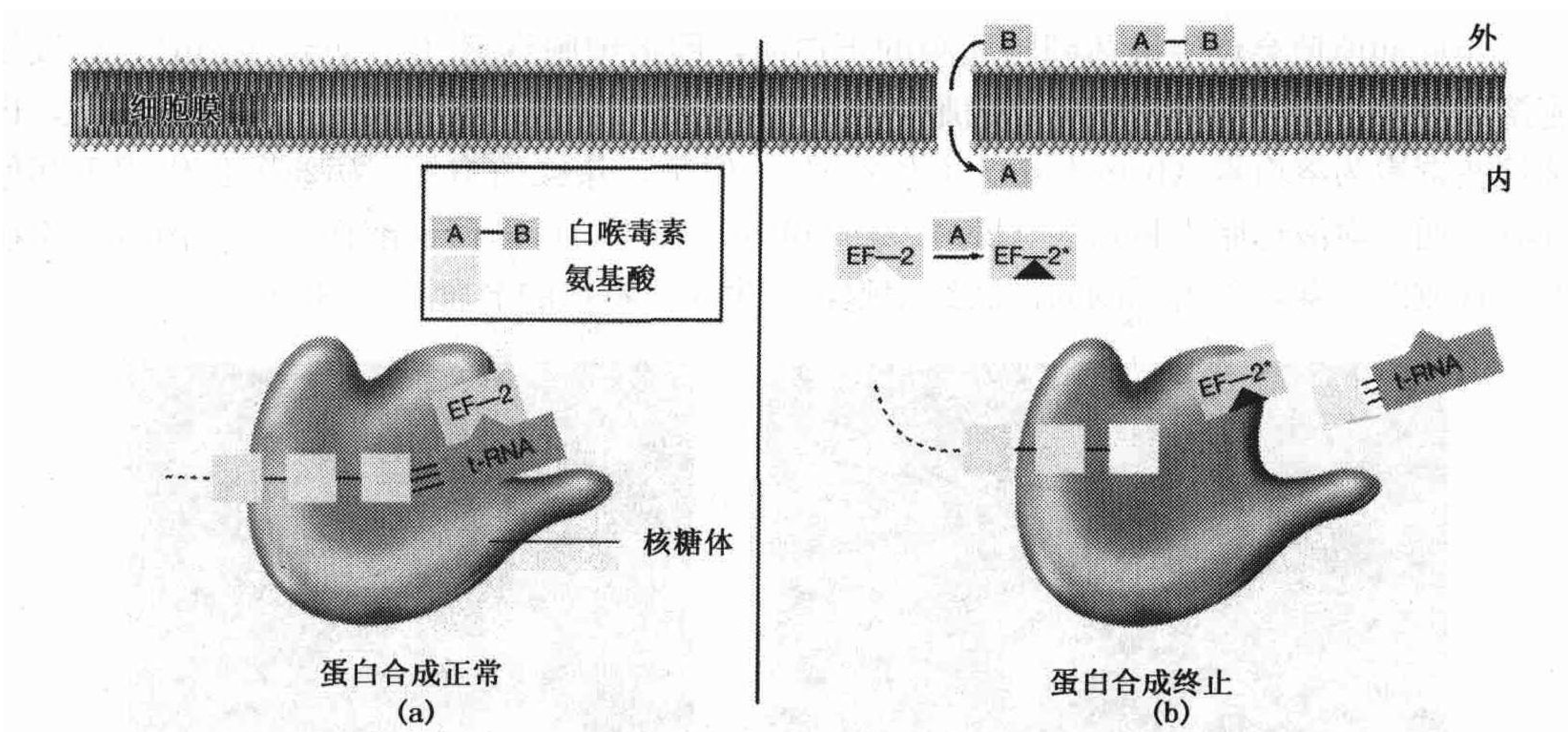


图 21.19 来自白喉棒状杆菌（*Corynebacterium diphtheria*）的白喉毒素的作用。（a）延伸因子 2（EF-2）通常结合于核糖体，引导携带氨基酸的 tRNA 到达核糖体，实现肽链延长。（b）白喉毒素结合在细胞膜，经过剪切后，肽段 A 进入细胞，催化 EF-2 的 ADP 核糖基化，被修饰的延伸因子不能帮助转运氨基酸延长肽链，导致蛋白质合成终止及细胞死亡。

白喉毒素是由白喉棒杆菌所产生的，此菌株可以被细菌噬菌体，即 β 噬菌体溶原化。这种毒素就是由噬菌体的基因编码的，非毒性和非致病性的白喉棒杆菌可以通过感染 β 噬菌体而变成致病性的（噬菌体的转化过程）（见 10.8 节）。

铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginson*）产生的外毒素 A（表 21.4）与白喉毒素十分类似，它也是把 NAD^+ 中的 ADP 核糖部分转移到延伸因子 2。

破伤风毒素和肉毒毒素

这些毒素由专性厌氧菌破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）和肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）两个种产生，二者都是正常的土壤微生物，但偶尔会与动物疾病状态有

关。二者均无侵袭力，其致病力源自毒性。肉毒梭菌有时直接在身体内生长，导致婴儿或伤口中毒，它也能在未适当保存的食物中生长和产生毒素（见29.6节）。中毒死亡主要是由于肌肉瘫痪引起的呼吸衰竭。破伤风梭菌生长在身体伤口部位的深处，此处是厌氧环境。虽然破伤风梭菌不会从感染的起始部位侵入身体，但它产生的毒素通过神经细胞传播，引起肌肉痉挛，瘫痪等破伤风的症状，经常导致死亡（见27.9节）。

肉毒毒素

肉毒毒素（botulinum toxin）是由一系列相关联的7种毒素组成的，是已知的毒性最强的毒素。1mg纯肉毒毒素足能够杀死百万只豚鼠。所描述的7种截然不同的肉毒毒素中只有两种是专门由肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）溶原性噬菌体编码的。最重要的一种毒素是与非毒性的肉毒梭菌蛋白质结合的一个具有寡聚肽生物活性的复合物。由于毒素结合到神经-肌肉连接突触的前膜上时，阻断了乙酰胆碱（acetylcholine）的释放，而由于神经冲动到肌肉的传递是通过乙酰胆碱与肌肉受体分子间相作用进行的，当肌肉收缩被抑制时，也就导致无力瘫痪及窒息死亡（图21.20）。

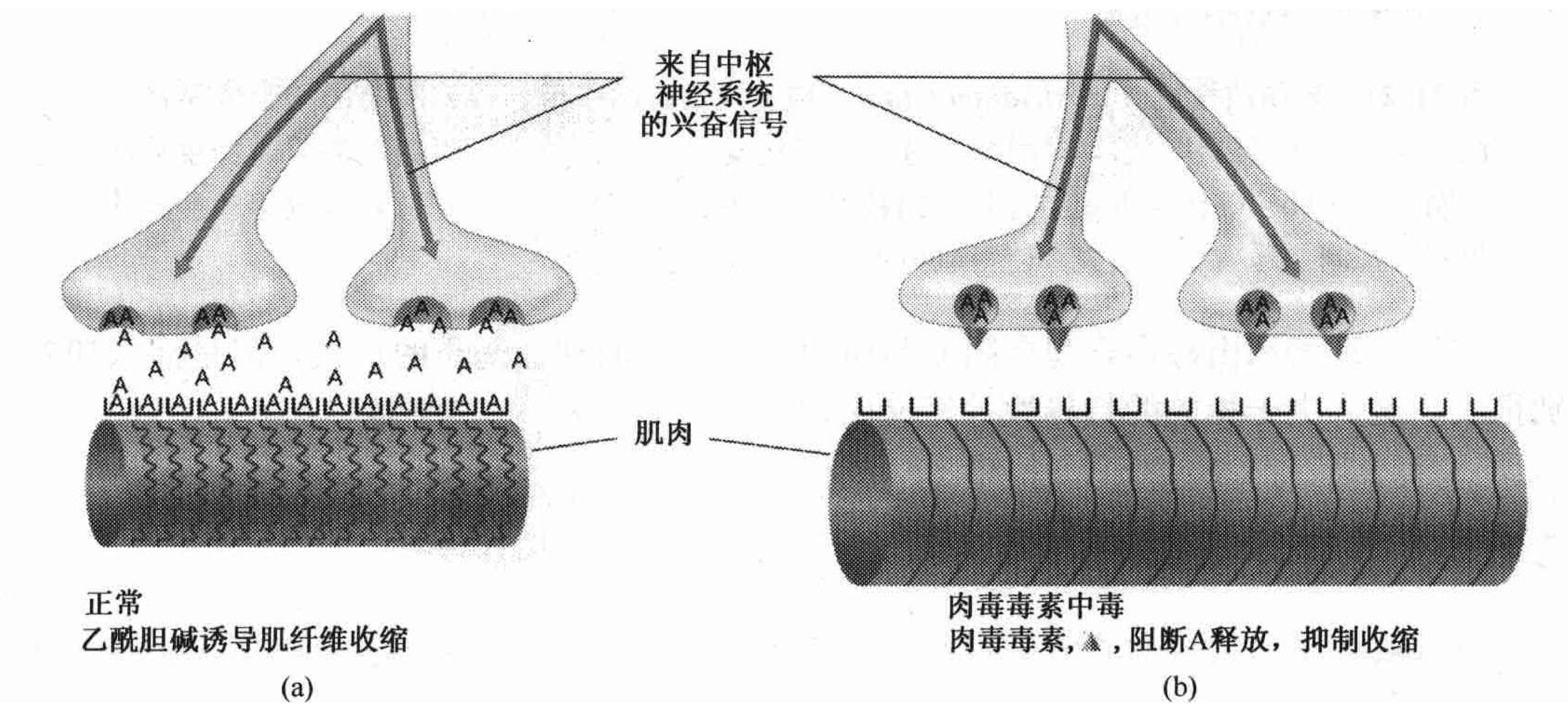


图21.20 肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）肉毒毒素的作用。（a）外周神经系统和脊椎受到刺激时，乙酰胆碱（A）在神经元一侧的运动终板通过小泡释放，然后作用到肌肉特异性受体引发收缩。（b）肉毒毒素在运动终板处阻止乙酰胆碱从小泡释放，导致肌纤维不能得到刺激，肌肉不可逆松弛，肌无力。

破伤风毒素

破伤风毒素（tetanus toxin）也是一种A-B蛋白毒素。一旦进入中枢神经系统，该毒素会通过运动神经元运送到脊髓束，在抑制性中间神经元处特异性地与神经节苷脂相结合。抑制性中间神经元通常会释放抑制性神经递质，如甘氨酸，结合到运动神经。通常，抑制性中间神经元释放的甘氨酸抑制运动神经元释放乙酰胆碱，抑制肌肉收缩，使肌肉处于放松状态。但是，如果破伤风毒素抑制甘氨酸释放，运动神经元不会被抑制，而引起破伤风，乙酰胆碱持续释放，肌肉不受控制地收缩（图21.21）。受影响肌肉会持续性收缩，就会发生痉挛、抽搐和瘫痪。如果涉及口腔上的肌肉，持续地痉挛会制约

口腔的运动，导致所谓的牙关紧闭症（trismus 或 lockjam）；如果影响到呼吸系统的肌肉，就会因窒息而死亡。

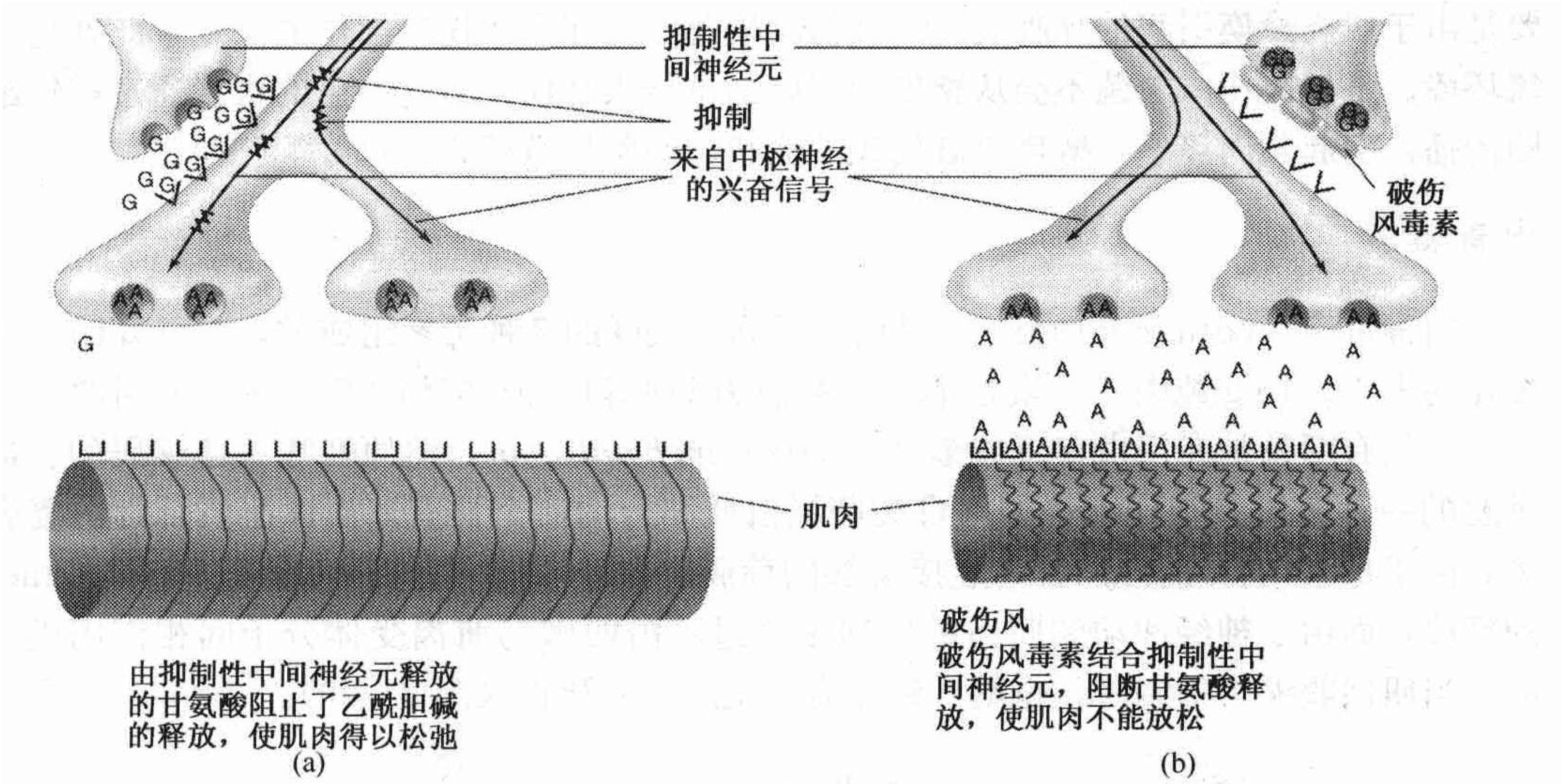


图 21.21 破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）破伤风毒素的作用。（a）肌肉的松弛依靠抑制性中间神经元释放甘氨酸，甘氨酸通过作用于运动终板处的神经元阻断乙酰胆碱释放从而抑制兴奋。（b）破伤风毒素结合到中间神经元，不让甘氨酸从小泡释放，导致运动神经元收到的抑制信号减少或消失，使得肌肉不可逆收缩，肌肉痉挛。

破伤风毒素和肉毒毒素都会阻断与肌肉控制有关的神经递质的释放，但是症状却差别很大，这取决于相关的特异性神经递质。

概念检查

最具破坏潜力的生物毒素是由病原菌产生的外毒素。每一种外毒素都作用于特异性的宿主细胞或分子，引起宿主重要细胞功能的损伤。

◆ 外毒素共有的关键特征是什么？A-B 外毒素特有的特征是什么？

◆ 细菌在宿主内的生长和感染对于毒素的产生是必需的吗？解释你的答案。

21.11 肠毒素

肠毒素（enterotoxin）是作用于小肠的外毒素。一般肠毒素会使大量的液体分泌物进入小肠腔内，导致呕吐和腹泻。肠毒素可以由各种各样的细菌产生，包括食物中毒微生物，如金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）、蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）及肠道病原菌霍乱菌、大肠杆菌、肠炎沙门氏菌（*Salmonella enteritidis*）。

霍乱毒素

霍乱毒素（cholera toxin）是由霍乱弧菌（*Vibrio chderae*）产生的肠毒素，也是导

致霍乱的致病因子，并且是了解最清楚的一种毒素（见 28.5 节）。霍乱毒素是一类 A-B 毒素（见 21.10 节），由 A 亚基和 5 个 B 亚基组成。B 亚基包含结合位点，通过 B 亚基，霍乱毒素可以特异性地与神经节苷脂 GM1（一种复杂糖脂）在上皮细胞质膜处结合（图 21.22），但 B 亚基自身不会导致膜渗透性的改变。换言之，有毒性作用的是 A

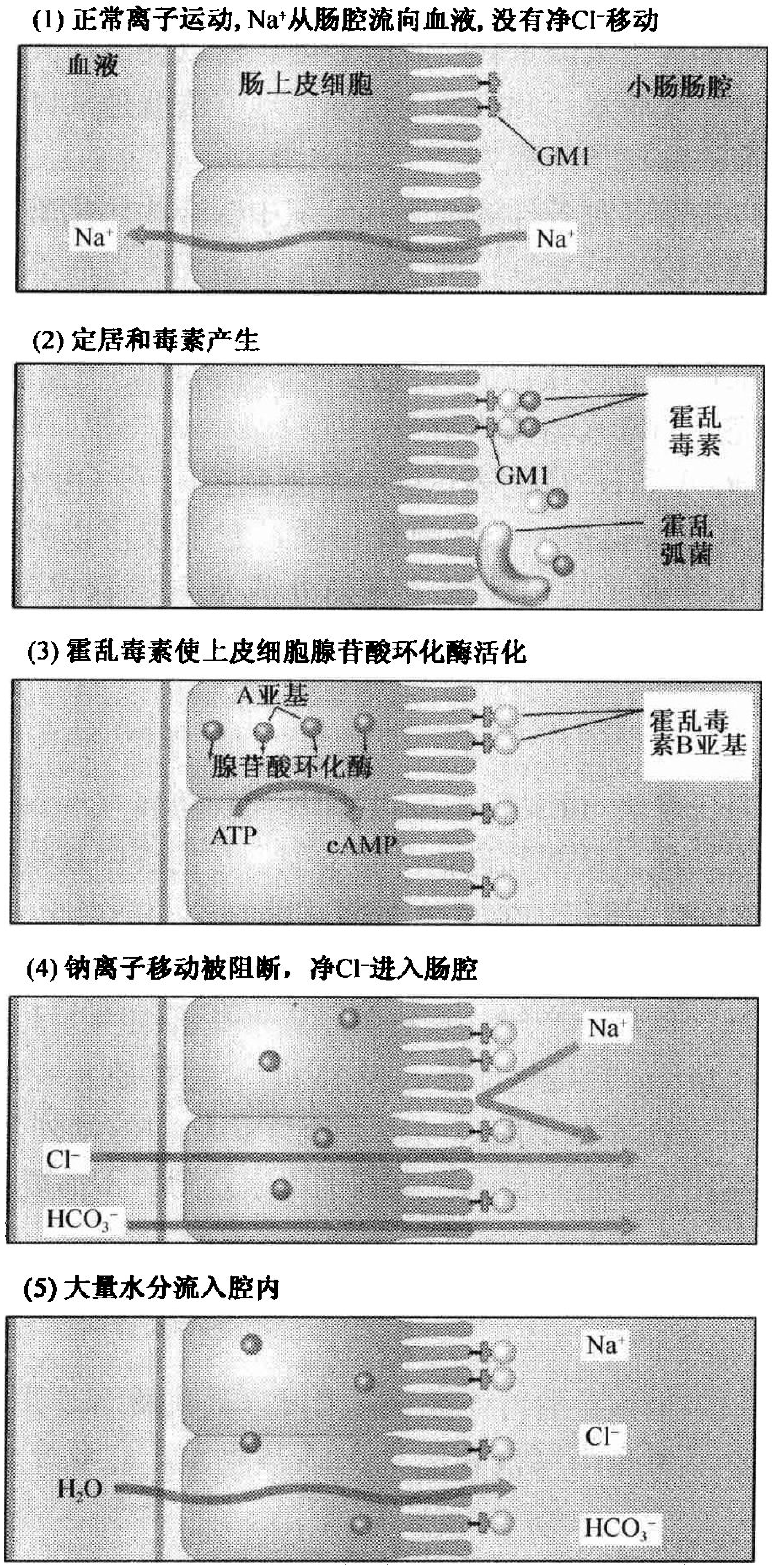


图 21.22　霍乱肠毒素的作用。（1）正常肠内离子运动情况。（2）霍乱弧菌依靠微绒毛黏附并定居在肠内，产生 A-B 型肠毒素，与宿主细胞 GM1 神经节苷脂相互作用，B 亚基（绿色）结合到 GM1 上，致使 A 亚基通过细胞膜进入细胞，激活腺苷酸环化酶。（3）导致 Na^+ 流动失调。（4）因细胞失水至肠腔内而腹泻。霍乱的治疗常采用离子替换型和促进再水合化的药物，抗生素类药虽可以限制霍乱弧菌生长，却对已产生的霍乱毒素束手无策。

链，它可以激活细胞内的腺苷酸环化酶（adenyl cyclase）的活性，此酶可以把 ATP 转化成 cAMP。

如在 8.7 节中所讨论的，环化的 cAMP 是细胞内多种调控体系的特殊介体，包括离子平衡。cAMP 浓度提高会引起黏膜细胞快速分泌氯离子和碳酸盐离子到肠腔中，肠腔中离子平衡改变会导致大量的水也流进肠腔中（图 21.22）。在霍乱剧烈活动时期，水分流失到小肠的速度远大于大肠重新吸收的速度，所以会出现大量的净流质损失。一般霍乱受害者都是死于极度脱水，此疾病的最好处理方法就是从口腔中饮入含有溶质的电解质溶液，以补充流质和离子的损失。

因为霍乱毒素可以激活各种各样的细胞和组织中腺苷酸环化酶，所以霍乱毒素的病理表现更多的与毒素结合位点特异性，即小肠上皮细胞相关，而不是与腺苷酸环化酶的毒素活性相关。实际上，如果先把它们进行处理，纯化的 B 亚基没有腺苷酸环化酶的活性，就可以抑制霍乱毒素的作用，因为纯化的 B 亚基可以与黏膜细胞上特异性霍乱受体相结合，可阻断完整的毒素与受体结合。

霍乱肠毒素基因 *ctxA* 和 *ctxB* 的表达受一个正调控因子（由 *toxR* 基因编码的一个蛋白）所调控。*toxR* 基因产物是一个穿膜蛋白质，它不仅可以控制霍乱毒素的产生，而且也可以控制其他几种重要的毒性因子［如外膜蛋白质和霍乱弧菌（*Vivrio cholerae*）能够在小肠上聚集所需要性毛］产生。

其他肠毒素

由肠道病原菌埃希氏菌属（*Escherichia*）和沙门氏菌属（*Salmonella*）细菌所产生的肠毒素与霍乱毒素在功能、结构和进化上相类似。在内脏中繁殖的细菌也会产生此类毒素。但是在有毒食物中，细菌［金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）、蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）］产生肠毒素的作用模式与此大不相同。例如，产气荚膜梭菌肠毒素是溶细胞毒素；金黄色葡萄球菌肠毒素（*Staphylococcus aureus*）是超抗原（表 21.4）。超抗原有一种完全不同的作用模式。它会刺激产生大量免疫淋巴细胞，导致系统性及肠内的剧烈反应（见 22.16 节）。有毒食物中的细菌毒素由宿主通过摄取已存在的毒素获得，不需要细菌在体内生长。

概念检查

肠毒素是一种专门作用于小肠的外毒素，它可以致使肠渗透性改变，并最终导致痢疾的产生。许多肠道病原菌在小肠内繁殖产生 A-B 毒素。有毒性食物中细菌经常产生溶细胞毒素或超抗原。

◆ 所有肠毒素的关键共性是什么？A-B 毒素呢？

◆ 描述霍乱弧菌毒素在小肠上的作用模式。为什么这种作用会导致大量流体损失？

21.12 内毒素

革兰氏阴性菌产生的具有潜在毒性的脂多糖，称为内毒素（endotoxin）。内毒素同

时也是 G^- 菌细胞壁的外层部分（见 4.9 节），但因为一般它们与细胞结合，只有当细胞溶菌时才大量释放，所以称为内毒素。相反，所有外毒素是活细胞的分泌产物。对内毒素的研究主要集中在大肠杆菌属（*Escherichia*）、志贺氏菌属（*Shigella*）及沙门氏菌属（*Salmonella*）细菌中。表 21.5 引出了内毒素和外毒素的主要区别。

表 21.5　内外毒素的基本特性

基本特性	外毒素	内毒素
化学特征	G^- 或 G^+ 菌分泌的蛋白质，热不稳定	脂多糖-脂蛋白复合物，细胞溶解
作用模式/症状	特异性，细胞毒素、肠毒素或神经毒素，对细胞或组织具有特定作用	普遍性，发烧、腹泻、呕吐
毒性	强毒性，常致死	微弱毒性，很少致病
免疫性	高度免疫原性，刺激中和抗体（抗毒素）产生	相对缺乏免疫原性，免疫反应不足以中和毒素
类毒素潜能	用甲醛对毒素进行处理将破坏毒性，处理后的毒素仍保持免疫原性	无
发烧与否	不会使宿主发烧	化脓，经常引起发烧

内毒素的结构和功能

图 4.34 和图 4.35 简单显示了脂多糖（LPS）的整体结构。脂多糖包含有脂类 A（lipid A）、核心多糖（core polysaccharide）和 *O*-多糖（*O*-polysaccharide）。

内毒素可以引起多种生理功能的改变。发烧（fever）几乎是一个普遍的症状，因为内毒素可以刺激宿主细胞释放一种内源性热源蛋白质（endogenous pyrogen），这种蛋白质可以影响大脑温度控制中心。然而，除此之外动物体也可能发展成腹泻，会出现淋巴细胞、白细胞及血小板数目的迅速减少，并且开始出现普通的炎症状态（见 22.3 节）。大剂量内毒素主要可通过引起出血性休克和组织坏疽而导致死亡。然而，内毒素的毒性远低于外毒素的毒性，如在鼠中，杀死实验动物群体一半所需的内毒素量（LD_{50}）为 200～400μg/鼠，而肉毒毒素的 LD_{50} 仅为 25pg，比内毒素剂量小上万倍。

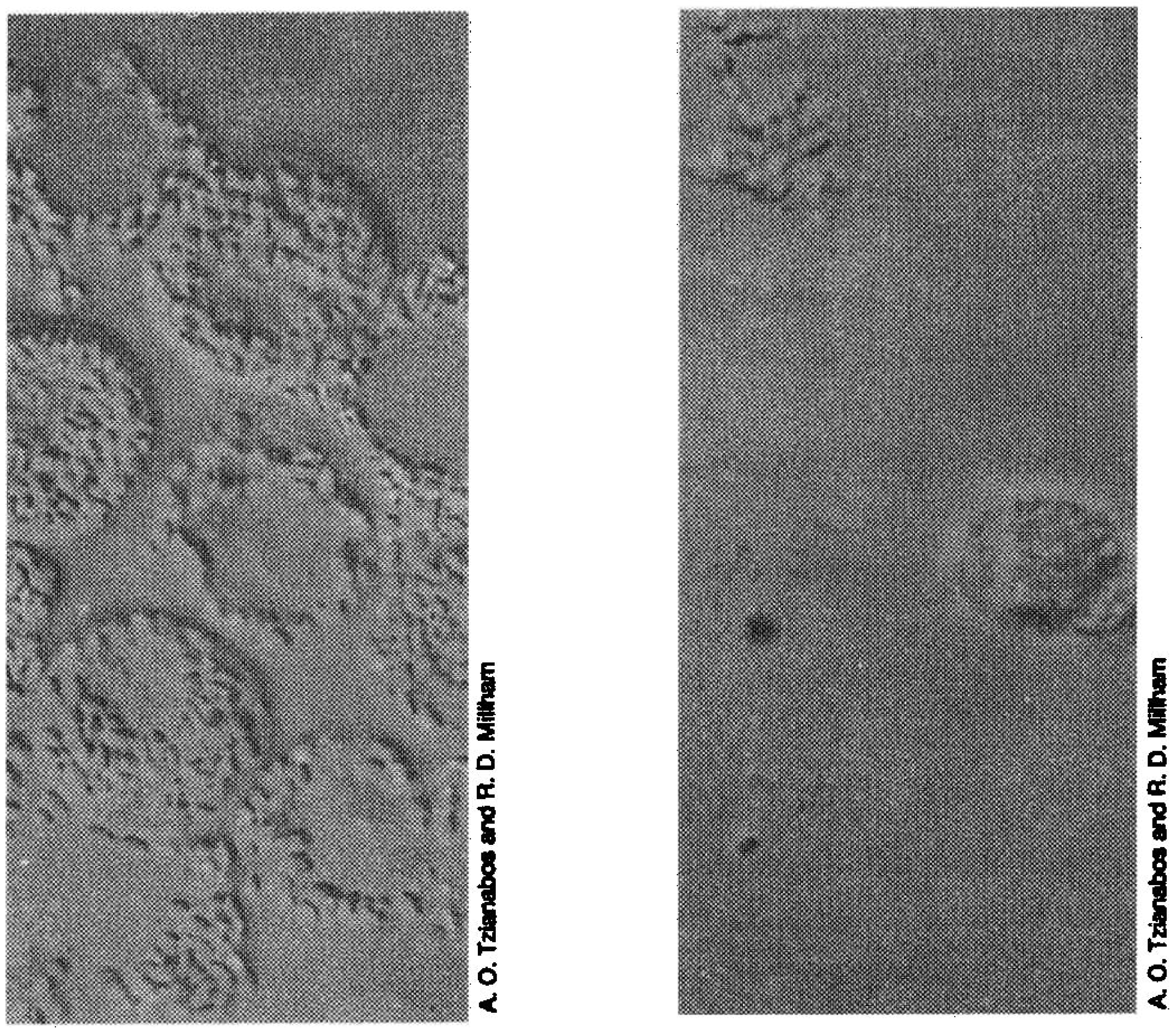
研究表明脂类 A 复合物起着毒性作用，而多糖主要起着使脂类呈水溶性及免疫原性的作用（见 22.5 节）。对动物研究已表现出，要获得毒性反应，需要内毒素复合体，即结合了多糖和脂类才可以。

内毒素的鲎变形细胞溶解检测试验

由于内毒素是发烧的诱导物，在配制药物上，如抗生素和静脉内的注射液，必须是远离内毒素。已经建立使用取自鲎（*Limulus polyphemus*）的变形细胞来检测内毒素的方法。此方法高度敏感，内毒素可特异性地导致变形细胞的溶解（图 21.23）。在标准变形细胞溶解检测试验中，把变形细胞抽提物与被检测的溶液相混合。如果有内毒素存在，变形细胞抽提物就会凝集和沉淀，使溶液浊度显著改变，这个反应可以用分光光度计定量测定。利用 10pg/ml 的脂多糖就可以进行这个检测反应。鲎变形细胞溶解检

测试验已用于检测血清中、脑脊髓流质中、饮用水和用于注射的流质中微量内毒素的存在。

鲎试验非常灵敏，所以必须万分小心，避免实验仪器、溶液、实验室中与革兰氏阴性菌反应的反应物和临床环境受到污染。在临床工作中，使用鲎试验检测血清或脑脊髓流质中内毒素的存在，可作为这些体液已感染革兰氏阴性菌的筛查试验。



(a)　　　　　　　　(b)

图 21.23　鲎属变形细胞光学显微镜照片。（a）正常细胞。（b）暴露在脂多糖中的变形细胞，脂多糖处理会使细胞失去颗粒形状，此反应用于检测脂多糖含量。

概念检查

内毒素是由革兰氏阴性菌产生的细胞壁外层的毒性组分。它依靠细菌裂解释放，在宿主内引起发烧及其他毒性症状。内毒素毒性弱于外毒素。通过鲎变形细胞溶解可检测内毒素的存在，表明物品已被革兰氏阴性菌污染。

- 为什么革兰氏阳性菌不产生内毒素？
- 为什么要检测药品中是否含有内毒素？

Ⅳ 引起感染的宿主因素

宿主因素既可以抑制也可以增强一种微生物的致病性。这里，我们首先介绍一些主要的危险因素，此类因素包括如年龄、遗传结构、组织特异性等，是宿主无法控制的。但是，像饮食、压力确实是潜在的可控制因素。本章将在解剖学的基础上对限制微生物感染和繁殖的物理和化学屏障进行讨论，总结这一章的内容。在下面的章节中，我们将讨论宿主对致病体接触的反应——免疫反应。

21.13 宿主的易感因素

很多因素影响宿主对感染和疾病的易感性。在此我们将讨论其中一些因素，并将它们和感染性疾病的进程联系起来。

年龄、压力、膳食

对感染疾病的敏感性来说，年龄是个重要的因素。在婴幼儿和老年人中，感染疾病十分相同。例如，在婴儿中，肠道微生物群落的产生相当迅速，但婴幼儿正常微生物群落与成年人的微生物群落是不相同的。在发展成成年人的微生物群落之前，尤其在婴儿出生后不久时期，病原菌具有更多的机会进入占据一定位置并产生疾病。因此出生一年以内的婴儿经常遭受由肠道病原菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）感染而引发腹泻。

这类儿童中毒源自一种肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）的肠道感染（见 29.6 节）。随着致病菌的繁殖和生长，它释放肉毒毒素，导致肢体麻痹（见 21.10 节）。此类疾病，因摄取了土壤、空气或者未加工的蜂蜜中的肉毒梭菌而被感染，却几乎未在一岁以上的儿童发现，大概因为在较大的儿童和成人的肠道中已建立起了正常的微生物群落，可以排除了肉毒梭菌的感染。

年龄（age）超过 65 岁以上的人就比年轻的成年人容易感染疾病。如年龄较大者对呼吸道感染，尤其是对流感较为敏感（见 26.8 节），这或许是因为年龄较大者对呼吸道病原菌的有效免疫力下降造成的。除此之外，随年龄增长自身解剖特征变化也有可能增加感染疾病的概率。例如前列腺肿大，年龄超过 50 岁的男子一般都会出现此症状，此症状经常导致尿流减少。这样，反过来就很容易使病原微生物在男性尿道聚集（图 21.11），因此也就使感染在老年人中有所增加。

压力（stress）能使正常健康人易患疾病。在对老鼠的研究中，如疲劳、过度节食、脱水或剧烈的气候变化，所有的生理压力源都可以增加感染疾病的范围和严重性。例如，用感染了沙门氏菌的老鼠做实验，发现那些长时间剧烈活动的老鼠比那些经过良好休息的老鼠显示出较高的死亡率。因压力所产生的激素与免疫系统的相互作用，在压力作为媒介所引起的疾病中起着关键的作用。当动物处于紧张情况下，激素平衡会有剧烈的变化。例如，在紧张情况下，可的松激素（cortisone）要比平静时候浓度高得多，这种激素是一种有效的抗炎因子。炎症的抑制减少了一种正常抵御疾病的防卫反应（见 22.2 节）。

膳食（diet）对宿主感染的易感性起重要作用。几世纪以来人们都知道饥饿与感染疾病之间的联系。蛋白质和热量的缺乏可以改变正常微生物群落的组成，因此也就为机会病原菌提供了一个很好的繁殖机会。例如，霍乱在营养不良的人群中比营养良好的人群中流行率高很多。另一方面，当把霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）注入食物以后，导致感染所需的霍乱弧菌的细胞数会剧烈减少，这或许是因为食物中和了在一般情况能破坏病原菌的胃酸（见 28.5 节）。

不食用一些特定的病原菌需要的物质可以起到抑制疾病的作用。此方面最好的例子

就是蔗糖对龋齿生成的影响。如 21.3 节中所讨论的，从进食的食物中去除蔗糖实际上就消除了牙齿腐烂（协同良好的口腔卫生）。在没有蔗糖存在的情况下，高度引发龋齿的细菌，如变异链球菌（*Streptococcus*）和表兄链球菌（*S. sobinus*）不能够合成细菌黏附于牙齿表面所需要的黏性的多糖外层。

妥协宿主

妥协宿主（compromised host）这个术语是指宿主中一个或多个抵抗机制出现故障，因而在这些部位增加感染的可能性。

在许多医院患者中，非传染病患者（如癌症和心脏疾病）经常死于微生物感染，因为他们是妥协宿主（见 25.7 节）。此类医院获得性感染称为医院感染（nosocomial infection），在美国每年有 200 万的人群受到感染，导致 10 万人死亡。医院里的许多措施如插入导管、皮下注射、脊椎穿刺或组织切片检查也可以把病原菌引入患者体内。手术对患者的心理压力也降低了患者对感染的抵抗力。用来减轻痛苦和消肿的抗炎药物也会降低宿主抗性（见 22.2 节和 22.3 节）。在器官移植过程中经常使用一些抑制免疫系统防止移植被排斥的药物，而这些具有抑制免疫力的药物大大降低了宿主对感染的抵抗力。

妥协宿主甚至也存在于医院外面。吸烟、过度饮酒、静脉注射毒品、缺乏睡眠、不良营养及自身感染都可以成为一个妥协宿主的条件。例如，HIV（人类免疫缺陷病毒）感染患者比未感染患者更易于受到微生物造成的一系列感染。HIV 通过破坏一类参与免疫反应的免疫细胞，如 CD4 T 淋巴细胞（见 22.7 节），引起获得性免疫缺陷综合征（AIDS）。由于 HIV 感染对宿主造成的损害，AIDS 患者不能对感染建立有效的抵御机制，常常死于一些机会致病菌造成的感染性疾病。机会致病菌（opportunistic pathogen）是一类在非妥协寄生宿主中无法引起疾病的微生物。

最后，一些特定的遗传条件也可以使宿主成为妥协宿主。例如，免疫系统中重要组成部分缺失的遗传疾病，这种患者会在幼年时就死亡，但并不是死于自身的遗传状况，而是死于微生物的感染。

概念检查

年龄、压力、膳食、健康、生活方式、原先的疾病或正患有的疾病及遗传结构都是影响宿主抵御感染能力的因素。

◆ 列举宿主不可控制的对感染易感的重要因素。

◆ 列举宿主可控制的对感染易感的重要因素。

21.14 抵抗感染的先天性免疫力

大多数动物都有抵抗致病菌的先天性的一道防线。这些包括组织特异性在内的物理和化学屏障，可非特异性地抑制病原体的侵染，从而预防疾病（图 21.24 和表 21.6）。

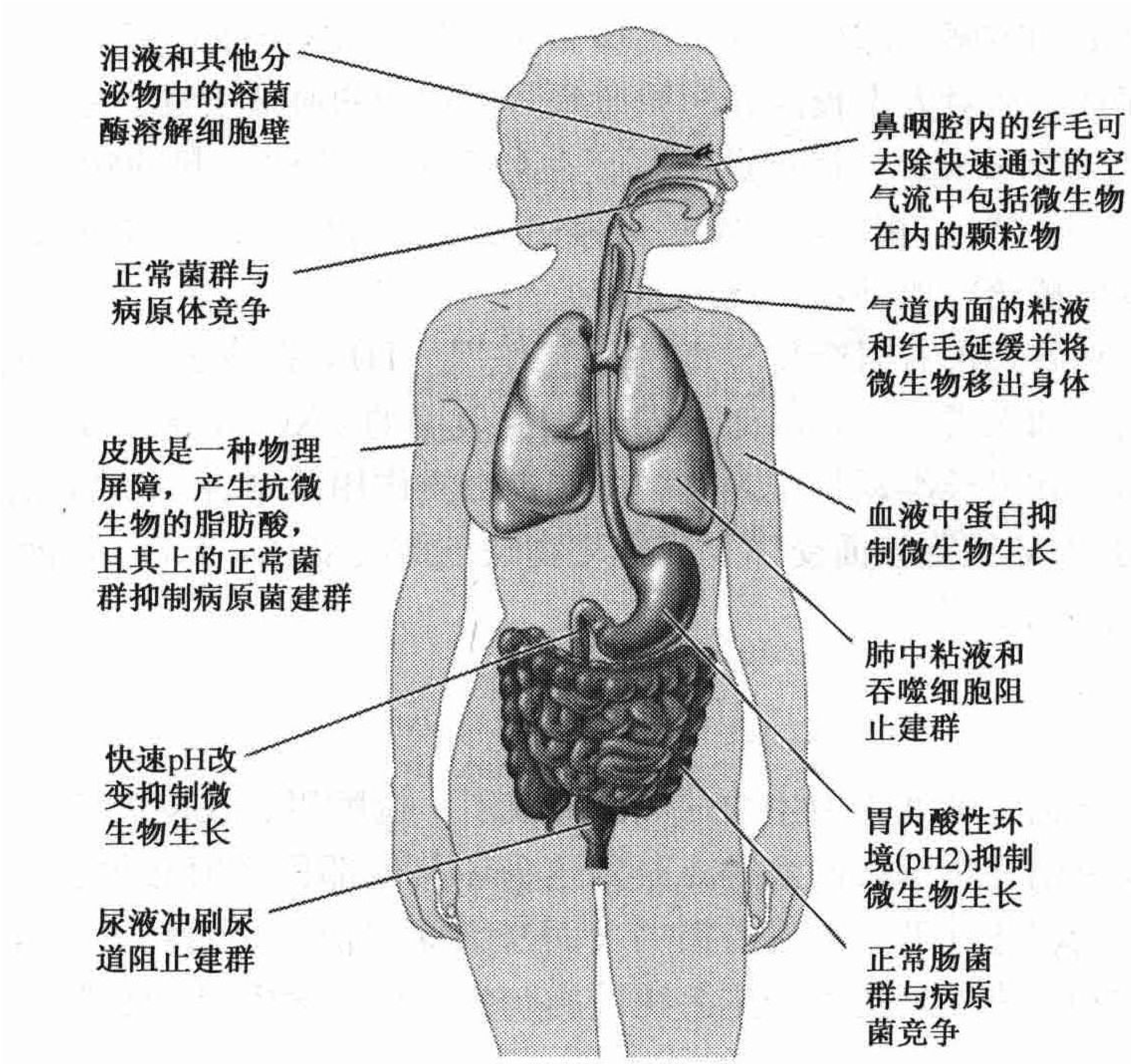


图 21.24　抵抗感染的物理、化学、解剖学屏障。这些屏障使人体可以天然的抵抗微生物建群和感染。

表 21.6　在感染疾病中的组织特异性因子

疾病	被感染的组织	微生物体
艾滋病(AIDS)	辅助性 T 淋巴细胞	人免疫缺陷病毒(HIV)
肉毒	运动终板	肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)
霍乱	小肠上皮	霍乱弧菌(*Vibrio chderae*)
龋齿	口腔上皮	变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、 表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)、 血链球菌(*Streptococcus sanguis*)、 缓征链球菌(*Streptococcus mitis*)
白喉	喉腔上皮	白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)
淋病	泌尿道上皮	淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)
疟疾	血液(红细胞)	疟原虫(*Plasmodium* sp.)
肾盂肾炎	肾盂	变形杆菌(*Proteu* sp.)
自发流产(牛)	胎盘	流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)
破伤风	抑制性中间神经元	破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)

天然宿主抵抗力

在特定条件下，亲缘关系近的物种，甚至于同一物种的不同个体可能对于某一特定致病菌会有不同易感性。某一种特定致病菌在某一动物种个体引起疾病的能力也是高度可变的。以狂犬病（rabies）为例，一旦表现出疾病发展的症状，几乎所有种类的动物都会死亡，然而，某些动物物种相对于其他物种对狂犬病更易感，如浣熊和臭鼬就比负

鼠对狂犬病感染更加敏感，却很少发生疾病。炭疽热（Anthrax）感染很多种动物并且导致不同疾病症状，从对人类较温和的脓疱到对牛致命的血液中毒。但是，肺部或空气传播的炭疽热（pulmonary），诸如此类用于生物武器的菌株引起的疾病，对人类几乎是致命的（见 25.13 节）；相反，鸟类对炭疽热完全具有免疫力。再举另一个例子，温血动物疾病很少传播给冷血动物，反之亦然。

最后，宿主和致病菌有时会特异性的相互作用。HIV 造成的感染仅存在于高等灵长类动物，包括猿和人类。这是因为人类 T 细胞表面的 CXCR4 蛋白和人类巨噬细胞表面的 CCR5 蛋白仅在灵长类动物中表达。这些蛋白质作用并结合于 HIV 的 gp120 蛋白，也是唯一已知的 HIV 细胞表面受体。其他动物缺乏此类受体，HIV 不能结合，因此免于 HIV 感染（见 26.14 节）。

物理和化学防御

组织表面的结构完整性为微生物的突破造成了一道障碍。在皮肤和黏膜组织，潜伏的微生物不仅要黏附在组织表面而且在其到达身体其他部位之前必须在这些位点生长。完整的表面通常会阻止建群，但是受损的表面（如穿刺伤），会容易形成菌落，促进侵染。宿主对建群和侵染的抵抗源于防御物质的产生和解剖学机制。主要解剖学防御的总结见图 21.24。

皮肤对于微生物的穿透是一道有效的屏障。皮肤上的皮脂腺（sebaceous gland）（图 21.2）分泌脂肪酸和乳酸，将皮肤的 pH 降到 5，抑制了许多致病菌的繁殖（血液和内脏的 pH 约为 7.4）。由鼻腔或口腔吸入的微生物，会被鼻咽和气管黏膜表面的纤毛上皮细胞（ciliated epithelial cell）清除掉。纤毛推动细菌细胞上行直至口腔分泌物中，或以吐痰的方式清除或咽下并在胃里被清除掉。

进入胃部的潜在致病菌必须能在酸性（pH 接近 2.0）条件下存活并与小肠内定居的过量微生物竞争（pH 5.0），最终还要通过大肠这一关（pH 6～7）。在一个正常成人的大肠中，每克肠道内含物包含 10^{10} 个或更多的微生物（见 21.4 节），使得新的微生物群体的建立非常困难。

肾内腔和眼睛表面常被含有溶菌酶（lysozyme）的分泌物浸润，它能显著降低微生物的数量（见 4.8 节）。胞外流体（如血浆）也含有杀菌物质。例如，被称为 β-溶细胞素（β-lysin）的血液蛋白通过结合和破坏细菌细胞质膜来发挥作用，导致细菌内容物泄漏和细菌死亡。

组织特异性

大多数致病菌必须首先结合暴露部位并在此繁殖。即使致病菌集合到暴露部位，但如果该位点与它们的营养和代谢需要不相符，也不能繁殖。因而，如果破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）被摄食，不会发生破伤风，这是因为致病菌会被胃内的酸性条件杀死。但是如果破伤风梭菌和孢子被带到很深的伤口中，它就能够在局部组织坏死导致的缺氧区繁殖产生破伤风毒素（见 21.10 节，27.9 节）。相反，肠道菌［如沙门氏菌和志贺氏菌（*Salmonella* 和 *Shigella*）］不会引起伤口感染但会成功地在肠道繁殖。表 21.6 介绍了组织的特异性。

在此，我们已经介绍了宿主的被动防御机制。在下一章，将介绍免疫的概念，并讨论宿主识别和靶向病原体的非特异性和病原体特异性防御机制。

概念检查

非特异性的物理、解剖学、化学的屏障阻止了大多数致病菌在宿主内的繁殖。这些防御的缺乏将导致宿主对致病菌感染和建群的易感性。

◆ 识别针对致病菌的物理和化学屏障。这些屏障是如何构成的？

◆ 预先存在的感染如何使宿主变得健康？

复习题

1. 区分寄生物（parasite）和病原菌（pathogen）。区分感染（infection）和疾病（disease）。（见 21.1 节）
2. 人体哪些器官一般会有微生物繁殖？这些器官有何共性？哪些器官一般不会有微生物存在？这些器官有何共性？（见 21.2 节）
3. 区分身体某一位点的外来（transient）和常住（resident）微生物。如何通过实验方法来区分？（见 21.3 节）
4. 为何链球菌属（*Strptococcus*）成员会造成龋齿？为何它们比其他种类微生物更易造成龋齿？（见 21.4 节）
5. pH 如何影响胃肠道不同部位微生物的类型？氧气浓度又是如何影响的？（见 21.5 节）
6. 描述在阴道内嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）与糖原之间的关系。为什么成年女性阴道正常菌群与少女不同？（见 21.6 节）
7. 区分糖被、荚膜和黏液层。这些特殊结构如何增强微生物的黏附？（见 21.7 节）
8. 举出一种单依靠产毒素（toxin-producing）致病的微生物，描述这种毒素和它的作用模式。举出一种单依靠侵袭力致病的微生物，什么因素赋予这种微生物侵袭力？（见 21.8 节）
9. 区分 A-B 毒素、细胞毒素和超抗原。每一类毒素给出一例。每种毒素如何引起疾病？（见 21.9 节）
10. 描述破伤风毒素和白喉毒素的作用机制。参考其作用机制，为什么这些毒素如此危险？（见 21.10 节）
11. 复习霍乱肠毒素的作用模式（图 21.22）。治疗此类疾病的方法是什么？为什么抗生素疗法不是很有效？简述金黄色葡萄球菌外毒素的作用模式，治疗此类疾病的方法是什么，为什么抗生素疗法不是很有效？（见 21.11 节）
12. 描述一种典型内毒素（endotoxin）的结构。内毒素如何引起发烧？什么微生物产生内毒素？（见 21.12 节）
13. 确定导致宿主妥协的普遍因素。鉴定哪些因素是宿主可控制的，哪些不是？（见 21.13 节）

14. pH 如何限制细菌感染？身体内或表面的那些地方的 pH 与标准身体条件值不一样？哪些微生物会从 pH 的差别中受益？（见 21.14 节）

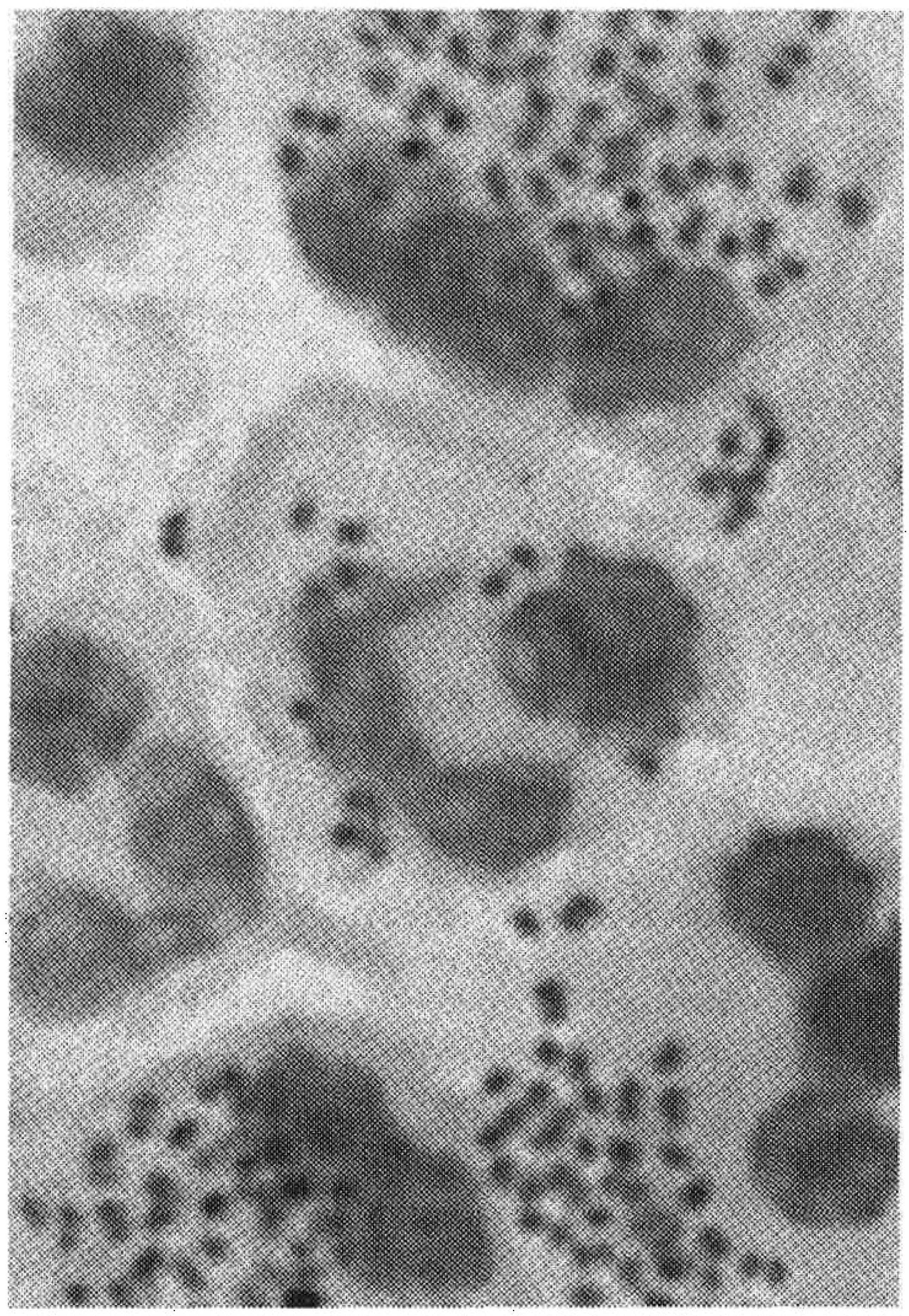
应用题

1. 黏膜是抵抗微生物繁殖和生长的屏障。但是，如喉部黏膜，却繁殖着很多种类的微生物，偶尔也会引起疾病。解释在特定条件下非致病性微生物如何变成致病性微生物。描述至少一种增强致病性的条件。
2. 抗生素疗法能显著地降低居住在胃肠道内的微生物数量。宿主内正常微生物群落的减少会导致什么症状？长期的抗微生物疗法常伴随着机会病原体的感染，其中许多病原体与患有艾滋病的个体由微生物导致机会感染的病原体相同（见 26.14 节）。这些病原体是哪些？为什么经历过抗生素疗法的人易受这些病原体的感染？
3. 了解导致肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）毒力和致病性提高的潜在的选择压力。了解导致破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）毒力和致病性提高的潜在的选择压力。是否任一种病原菌毒力的提高都会为其带来选择优势？对每一种都要考虑其自然栖息地。
4. 凝固酶是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的一种毒力因子，它通过在金黄色葡萄球菌的生长位点形成凝块发挥作用。溶栓酶是化脓性链球菌（*Streptococcus pyogenes*）的一种毒力因子，它通过在化脓性链球菌的生长位点分解凝块发挥作用。试分析这两种增强致病性的相反策略的共同点。
5. 尽管能相对容易地分离得到不能产生外毒素的突变体，但要得到不能产生内毒素的突变体却难得多。如何能得知这些类型毒素的结构和功能？解释其中回复突变的差异。

（乔文涛 译，牛淑敏 校）

22

免疫学基础



免疫开始于吞噬细胞的先天应答，本图显示的是捕获了淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）的人体组织。不论先天免疫还是获得性免疫，其发生机制都是由限制病原体扩散的炎症反应开始的。

词汇表

获得性免疫（adaptive immunity）：或者称为抗原特异性免疫。是由识别和消灭某种病原体及其产物，及依赖以前接触过的某病原体或其产物而获得抗感染的能力

抗体（antibody）：由B细胞产生的可溶性蛋白质，能和抗原相互作用，也叫免疫球蛋白

抗体介导的免疫（体液免疫）（antibody-mediated immunity，humoral immunity）：直接与抗体相互作用所产生的免疫

抗原（antigen）：能和免疫系统中特异性免疫组分相互作用的分子

抗原决定簇（antigen determinant，epitope）：那些能和特异性抗体和T细胞受体反应的抗原蛋白，也叫表位

抗原呈递细胞（antigen-presenting cell，APC）：指巨噬细胞，树突状细胞和B细胞，这些能够将加工过的抗原肽呈递给T细胞的细胞

自身抗体（autoantibody）：指能与自身抗原反应的抗体

B细胞（B cell）：具有免疫球蛋白的表面受体，且产生免疫球蛋白，并能将抗原呈递给T细胞的一种淋巴细胞

细胞介导免疫（cell-mediated immunity，CMI）：直接与抗原特异性T细胞相互作用而引起的免疫

MHC Ⅰ类蛋白（class I MHC protein）：存在于所有的脊椎动物有核细胞表面的抗原呈递分子

MHC Ⅱ类蛋白（class II MHC protein）：主要存在于巨噬细胞，B细胞和其他抗原呈递细胞表面的抗原呈递分子

补体（complement）：以一种有序的方式与抗原-抗体复合物反应的一系列血清蛋白，其反应后可以放大和增强抗体的活性

细胞因子（cytokine）：由白细胞产生的可溶性免疫应答调节剂

树突状细胞（dendritic cell）：具有吞噬和抗原呈递功能的一种淋巴细胞。存在于淋巴结和脾脏

结构域，功能区（domain）：蛋白质分子中具有一定结构和功能的区域

半抗原（hapten）：能与特异性抗体结合，但自身不能诱发免疫应答的低分子质量的物质

超敏反应（hypersensitivity）：导致宿主组织损伤的免疫应答

免疫（immunity）：指机体抗感染的能力

免疫接种（接种疫苗）（immunization，vaccination）：用灭活或减毒的病原体或者病原体产物接种宿主以刺激其产生保护性免疫

免疫原（immunogen）：能引发免疫应答的分子

免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）：由B细胞和浆细胞产生的可溶性蛋白质，能与抗原相互作用，也叫抗体

炎症（inflammation）：对有害刺激（如毒素和病原体）所产生的非特异性反应，以红斑、肿胀（水肿）、疼痛和发热（发烧）为特征，通常发生在感染部位

先天免疫（innate immunity）：或称非特异性免疫，指无诱导即可识别和消除某种特定病原体或其产物抗感染的能力，其不依赖于以前接触过某病原体或其产物的免疫。

白细胞介素（interleukin，IL）：由白细胞产生的可溶性细胞因子和趋化因子

白细胞（leukocyte）：血液中的有核细胞（白血球）

淋巴（lymph）：像血液一样的液体，但不含有红细胞。通过一个单独的循环系统（淋巴系统）运行。淋巴系统包括淋巴结，它可以过滤颗粒性物质，如细菌细胞等

淋巴细胞（lymphocyte）：血液中参与免疫应答所有的有核细胞都叫淋巴细胞
巨噬细胞（macrophage）：一种存在于组织中，具有吞噬和抗原呈递功能的大型白细胞
主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）：负责编码细胞表面几种重要抗原呈递蛋白的遗传复合物
免疫记忆（immunologic memory）：当遇到以前曾接触到的抗原后能迅速产生大量特异性免疫细胞或抗体的能力
记忆 B 细胞（memory B cell）：对某种抗原特异性应答长寿的细胞
天然杀伤细胞（natural killer cell）：能以非特异方式识别和消灭外来细胞或被感染的宿主细胞的一种特殊的淋巴细胞
嗜中性粒细胞（多形核白细胞）（neutrophil Leukocyte，polymorphonuclear leukocyte，PMN）：一类具有吞噬功能，颗粒细胞质和多形态细胞核的白细胞
病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）：被模式识别分子识别的微生物或病毒的一种结构成分
模式识别分子（pattern recognition molecular，PRM）：一种膜连接蛋白，负责识别病原体相关分子模式，即识别微生物细胞表面结构中某一成分的膜连接蛋白
吞噬细胞（phagocyte）：能识别、摄取和消灭病原体和病原体产物的一类细胞
血浆（plasma）：去除血细胞和灭活凝集蛋白后的血液的液体部分
浆细胞（plasma cell）：能产生大量抗体的分化的 B 细胞
初次抗体应答（primary antibody response）：首次接触抗原所产生的抗体，通常为 IgM
再次抗体应答（secondary antibody response）：第二次（后来）接触抗原所产生的应答，通常为 IgG
血清学（serology）：体外研究抗原-抗体反应的学科
血清（serum）：去除凝集蛋白和细胞的血液的液体部分
特异性（specificity）：与独特抗原发生免疫应答的能力
干细胞（stem cell）：能够发育成各种类型终细胞的细胞
超抗原（superantigen）：病原体产物，能刺激超常数量的 T 细胞而引发超强的免疫应答
T 细胞（T cell）：负责抗原特异性细胞间相互反应的淋巴细胞，T 细胞可分为不同的功能亚群，包括杀伤性 T 细胞（T_C）和辅助性 T 细胞（T_H），T_H 可进一步分为诱导性 T 细胞（T_H1）和可协助 B 细胞产生抗体的辅助性 T 细胞（T_H2）
T 细胞受体（T-cell receptor，TCR）：T 细胞表面的抗原特异性受体蛋白
耐受（tolerance）：指对特异性抗原无应答的能力
Toll 样受体（Toll-like receptor，TLR）：存在于巨噬细胞上的模式识别分子家族的成员之一，负责识别病原体相关分子模式
类毒素（toxoid）：减毒的毒素，保留了其免疫原性而丧失其毒性
疫苗（vaccine）：用于刺激机体产生保护性免疫的灭活或减毒的病原体，或无毒的病原体产物

所有多细胞生物体都依赖于各种细胞及其产物的相互作用来防止和对抗病原体的入侵和感染，这一过程叫免疫（immunity）。在第 21 章中，我们已经讨论了被动的物理和化学防护如何对抗病原体的入侵，本章我们将介绍主动对抗病原体的机制。从先天免疫（innate immunity）或称非特异性免疫（nonspecific immunity）开始，机体在结构

上具备了识别和消灭病原体或其产物的能力。先天免疫主要是吞噬细胞（phagocyte）的作用，它不依赖于机体以前是否接触过病原体或其产物，就可识别、吞食、杀死和消化大多数的病原体。但不幸的是，先天免疫并不总是有效的，危险的感染有时依然发生。然而，吞噬细胞也能够参与另一类称为获得性免疫（adaptive immunity）或特异性免疫（specific immunity）的防御机制，与病原体感染进行较量。获得性免疫是识别和消灭病原体及其产物后而获得的能力，需要免疫系统和病原体直接接触，吞噬细胞利用部分消化过的病原体分子活化淋巴细胞（lymphocyte）而引起特异性免疫。每一个淋巴细胞都被遗传性地赋予了具有只识别病原体上的一种称为抗原（antigen）的分子的能力。抗原就是能与淋巴细胞表面特异性受体相互作用的分子（见 22.4 节）。当淋巴细胞与抗原相互作用时，使可迅速生长和分裂形成许多自身的复制品。这些抗原反应性淋巴细胞的复制品，也叫克隆（clone）。可直接消灭这一特定抗原，或产生以抗原为靶标的可溶性的特异性蛋白质，称为抗体（antibody）。这种能识别某一种特定抗原的能力称为免疫的特异性（specificity）。

有些抗原反应性淋巴细胞可存活数年，如果在后来的日子里我们接触了同一种抗原，这一特异性淋巴细胞成员就迅速扩增，产生强有力的免疫应答。这种对再次接触抗原的更强的反应能力称为免疫记忆（immunologic memory）。

免疫系统对病原体抗原的反应是很强烈的，而且还具有安全机制以防止自身细胞受到损伤。免疫系统这种只破坏危险的非己病原体抗原而不损伤自身抗原的能力称为免疫耐受（immune tolerance）。不幸的是，有时会发生耐受的缺陷，造成免疫系统不适当的应答而损伤宿主组织，产生自身免疫性疾病（autoimmune disease）。

在本章中我们将首先了解由吞噬细胞引发的先天免疫是如何应对病原体，然后我们还将介绍同样的吞噬细胞是如何呈递抗原活化淋巴细胞，诱发获得性免疫应答的。活化的淋巴细胞只识别单一抗原［特异性（specificity）］，再次遇到该抗原时免疫应答会更强烈［记忆性（memory）］，而不损伤宿主自身细胞［耐受性（tolerance）］。先天性和获得性免疫力使得动物免受病原体的危害。这就是病原体防御的重要组成部分。

Ⅰ 免疫系统概述

免疫应答已经发展到能识别任何外源分子，特别是病原体来源的抗原分子。抗原特异性应答的目标是破坏与其反应的分子，这里我们介绍宿主对病原体和其他外源物质的先天和获得性应答的一些重要特征。先天性应答识别所有外源分子和病原体，而获得性应答只针对病原体的单一分子。我们从免疫细胞和免疫器官开始，然后介绍先天免疫中的细胞及其机制，最后概述特异性免疫或获得性免疫来结束本章的内容。

22.1 免疫系统的细胞和器官

先天性和获得性免疫都是由血液（blood）或淋巴（lymph）中的细胞引起的。这些细胞直接或间接地与机体所有重要器官相互作用。免疫系统中所有的细胞都是由共同的前体细胞，即干细胞（stem cell）发育而来，这些干细胞存在于骨髓中。

血液和淋巴成分

血液由细胞和非细胞成分组成，并且含有许多免疫应答中的细胞和分子。由于血液可以很容易且安全地在患者身上获得，因此血液成为免疫应答试验中有价值的材料来源。人血液中的大多数细胞为红细胞（erythrocyte），红细胞为无核细胞，其主要功能是从肺部携带氧然后送到全身各个组织中（表 22.1）。血液中大约 0.1%的细胞是白细胞（leukocyte），白细胞包括各种吞噬细胞（如单核细胞），还有参与抗体产生和细胞介导免疫的淋巴细胞。淋巴（lymph）是和血液相似的液体，但不含有红细胞。

如图 22.1 所示，骨髓中的干细胞是血细胞和白细胞共同的祖先。干细胞在一系列称为细胞因子（cytokine）的可溶性细胞蛋白质的影响下分化产生成熟的细胞（见 23.11 节）。

表 22.1 正常人血液中的主要细胞

细胞类型	每毫升血中的细胞数/个
红细胞	$4.2\times10^{9}\sim6.2\times10^{9}$
白细胞[a]	$4.5\times10^{6}\sim11\times10^{6}$
淋巴细胞	$1.0\times10^{6}\sim4.8\times10^{6}$
髓样细胞	$<7.0\times10^{6}$

a. 白细胞包括所有有核血细胞，再分为淋巴细胞和髓样细胞（单核细胞和粒细胞）。

全血是由血浆（plasma）和悬浮于其中的细胞组成，血浆是含有蛋白质和多种其他溶质的液体。在体外，全血或血浆会很快形成不溶性凝块，这是由于可溶性血浆蛋白、纤维蛋白原（fibrinogen）转变成不溶性纤维蛋白（fibrin）造成的。只有加入抗凝剂，血浆或全血

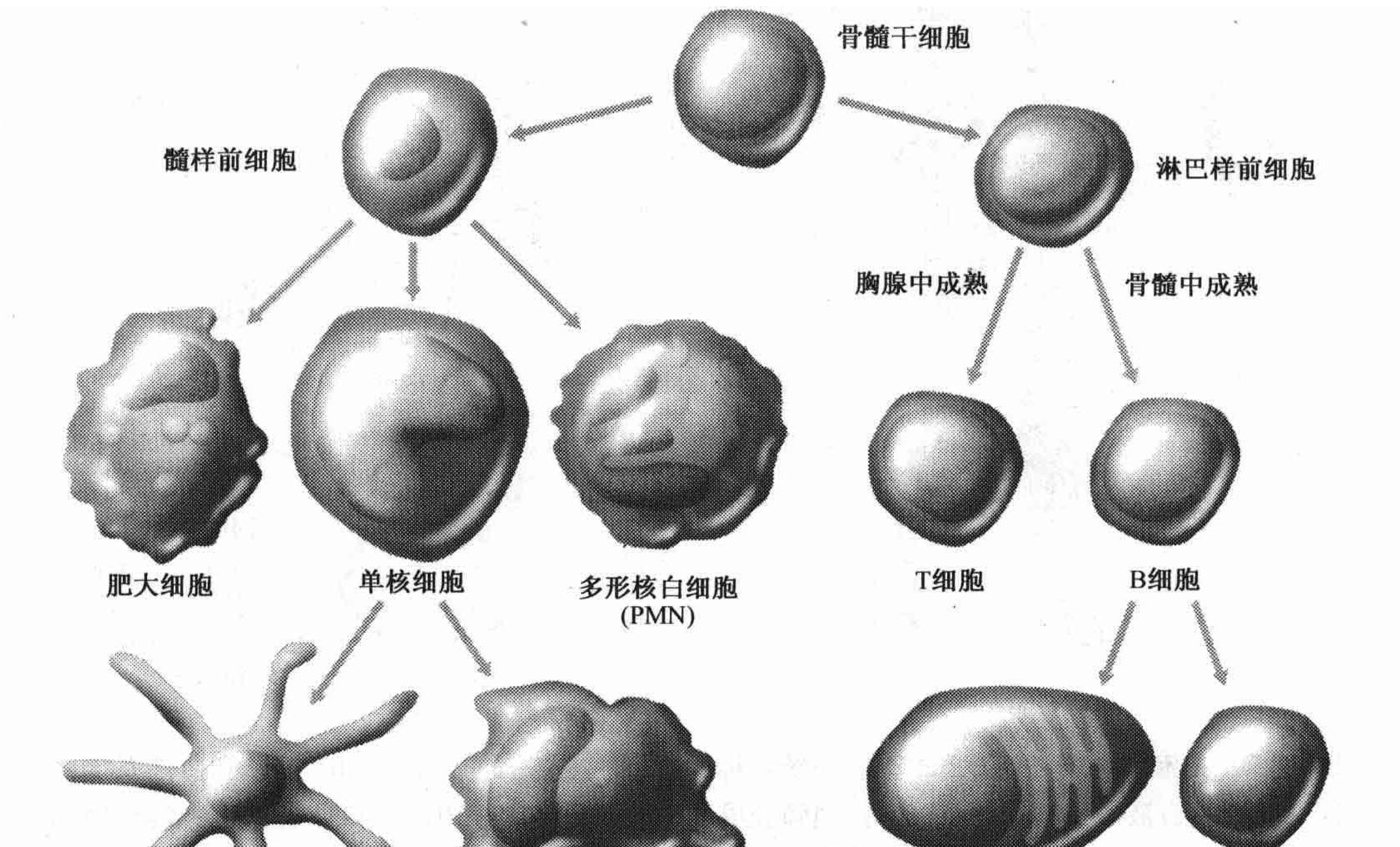


图 22.1 免疫应答中主要细胞的起源。免疫细胞来源于两种主要的前细胞，髓样前细胞能形成各种吞噬细胞，它们与先天免疫和抗原呈递关系密切。淋巴样前细胞发育成 T 细胞和 B 细胞，它们是直接参与抗原特异性免疫应答的细胞。

才能保持液体状态。抗凝剂包括草酸钾、柠檬酸钾或肝素，都可以防止纤维蛋白原转变成纤维蛋白，终止凝块的形成。凝块是指不溶性蛋白质夹带血细胞形成大的不溶性团块。去除团块后的液体称为血清（serum），血清不含细胞和凝集蛋白。但血清中含有高浓度的其他蛋白质，包括可溶性抗体蛋白。血清被广泛应用于免疫学研究领域（见24.7节）。血清学（serology）是体外（*in vitro*）研究抗体抗原反应的科学。

血液和淋巴循环

血液由心脏泵出，通过动脉和毛细血管进入全身各个部位，然后通过静脉回到心脏（图22.2a，b）。图22.2a，b和c表示毛细血管床，白细胞经过此处从血液中进入淋巴系统（lymphatic system）。淋巴系统是通过淋巴循环而独立的一个循环系统。

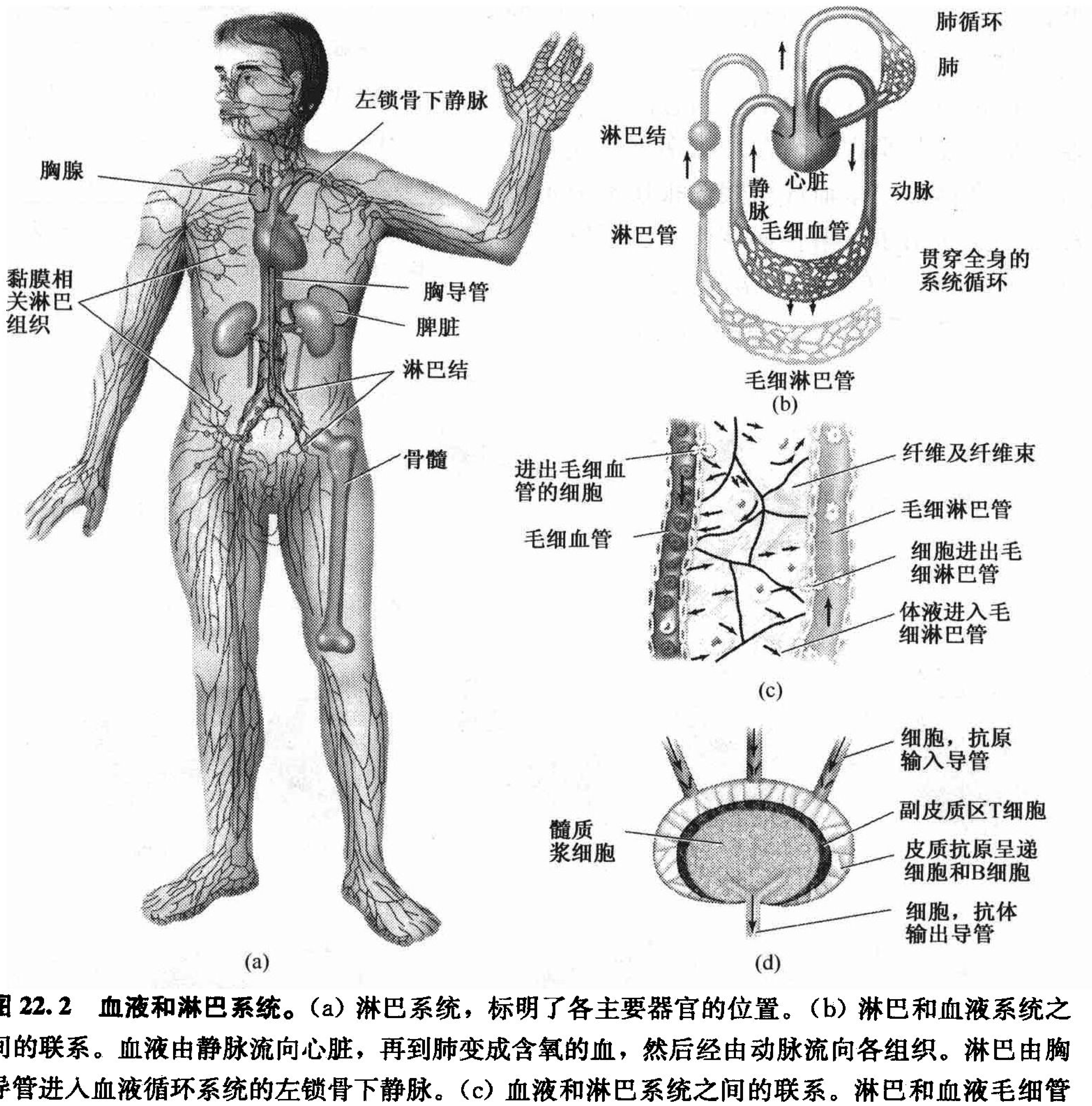


图22.2 血液和淋巴系统。(a) 淋巴系统，标明了各主要器官的位置。(b) 淋巴和血液系统之间的联系。血液由静脉流向心脏，再到肺变成含氧的血，然后经由动脉流向各组织。淋巴由胸导管进入血液循环系统的左锁骨下静脉。(c) 血液和淋巴系统之间的联系。淋巴和血液毛细管都是闭合的管道，但是细胞和液体能以外渗的方式由一个管道进入另一管道。(d) 淋巴结。此图标出了淋巴结的主要结构，免疫细胞的分布。

从外周脉管组织来的淋巴液进入毛细淋巴管，然后经过淋巴系统进入淋巴结（lym-

phatic node)（图 22. 2d），淋巴结中有高浓度的白细胞和吞噬细胞。当它们经淋巴导管进入淋巴结时，在这里与微生物和抗原相遇，脾在血液循环中具有相似的功能。淋巴结和脾是最重要的获得性免疫应答的场所，携带抗体和免疫细胞的淋巴液经胸淋巴导管又返回循环系统。

白细胞

白细胞（leukocyte）是存在于血液和淋巴中的有核白血细胞。表 22. 1 和图 22. 1 表示几种特殊的白细胞及它们在先天性和获得性免疫中的作用。淋巴细胞（lymphocyte）是在特异性免疫应答中发育的特异性白细胞。成熟的淋巴细胞聚集在淋巴结和脾脏，在此处与抗原相互作用。淋巴细胞可进一步分化为 B 细胞（B cell）和 T 细胞（T cell）（图 22. 1）。B 细胞起源于骨髓，并在骨髓中成熟，成为抗体产生浆细胞（plasma cell）的前体。髓样细胞是由髓样前细胞发育而来的（图 22. 1），并进一步分化为功能不同的两大类型。单核细胞是特化的巨噬细胞（macrophage）和树突状细胞（dendritic cell）的前体，机体各组织及脾脏和淋巴结中富含吞噬细胞和树突状细胞，在那里它们被称为抗原呈递细胞（antigen-presenting cell，APC），因为它们具有吞噬、加工抗原并呈递抗原给淋巴细胞的特异功能（见 22. 5 节）。粒细胞是含有细胞质内含物或颗粒的细胞，可以通过染色技术进行鉴别。多形核白细胞（polymorphonuclear leukocyte），也称为嗜中性粒细胞（neutrophil）或 PMN（polymorphonuclear neutrophil），是具有吞噬功能的粒细胞（见 22. 2 节）。嗜碱性粒细胞（basophil）是含有毒性化学物质颗粒的粒细胞，这些颗粒的释放，称为脱颗粒（degranulation），可能引起变态反应样症状（见 22. 15 节）。

白细胞可以到达全身各个部位，并可以离开血液到组织间隙和淋巴组织中，然后再返回血液循环系统，这个过程叫外渗（extravasation）（图 22. 2）。

概念检查

免疫组织中所有的细胞均来源于骨髓中共同的干细胞。血液和淋巴系统中具有循环功能的细胞和蛋白质对维持免疫系统的功能是十分重要的。有多种白细胞共同参与免疫应答。

◆ 描述白细胞从血液到淋巴，再返回血液循环的过程。

◆ 追踪 B 细胞、T 细胞和巨噬细胞如何从共同干细胞发育而来。

22. 2 先天免疫应答

在第 21 章中我们描述了在偶然情况下，病原体能够突破宿主的物理和化学防御机制（见 21. 4 节）然后感染宿主（见 22. 7 节），而就在这一刻，也一定会动员免疫系统来对抗感染，抗感染的第一道防线就是先天免疫（innate）或非特异性（nonspecific）免疫反应。

先天免疫的起始点就是与外源性物质的接触。例如，病原体或其产物与吞噬细胞

(phagocyte) 的接触。吞噬细胞是白细胞中能够吞噬和杀伤外源物质的一种细胞，这种相互作用通常的结果是由复杂的宿主介导的过程，称为炎症 (inflammation)。

本章中，我们将介绍识别病原体的细胞和分子，以及所引起的炎症反应，我们还将解释病原体对抗吞噬细胞的机制。在下一节中，我们还会详细地解释炎症反应。

吞噬细胞

引起炎症反应的起始细胞通常是吞噬细胞（字面上可看出是会吃的细胞）。吞噬细胞的主要功能是吞噬和杀伤病原体，在此过程中，有些吞噬细胞还可以作为抗原呈递细胞，产生肽抗原以激活获得性免疫应答。

吞噬细胞包括巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和树突状细胞，这些细胞遍布于全身各组织器官和体液中。吞噬细胞通常是会运动的（阿米巴运动）。吞噬细胞大多具有颗粒内含物，称为溶酶体（lysosome)，其中含有杀菌物质，如过氧化氢、溶菌酶、蛋白酶、磷酸酯酶、核酸酶和脂肪酶。吞噬细胞一般在血管壁、纤维凝块这样的表面捕捉并吞噬病原体，用细胞膜包围病原体，并逐渐合拢形成吞噬体运入细胞内，在胞内和溶酶体融合形成吞噬溶酶体（phagosome)。吞噬溶酶体中的毒性物质和酶将吞入的微生物细胞杀死并消化（图 22.3)。

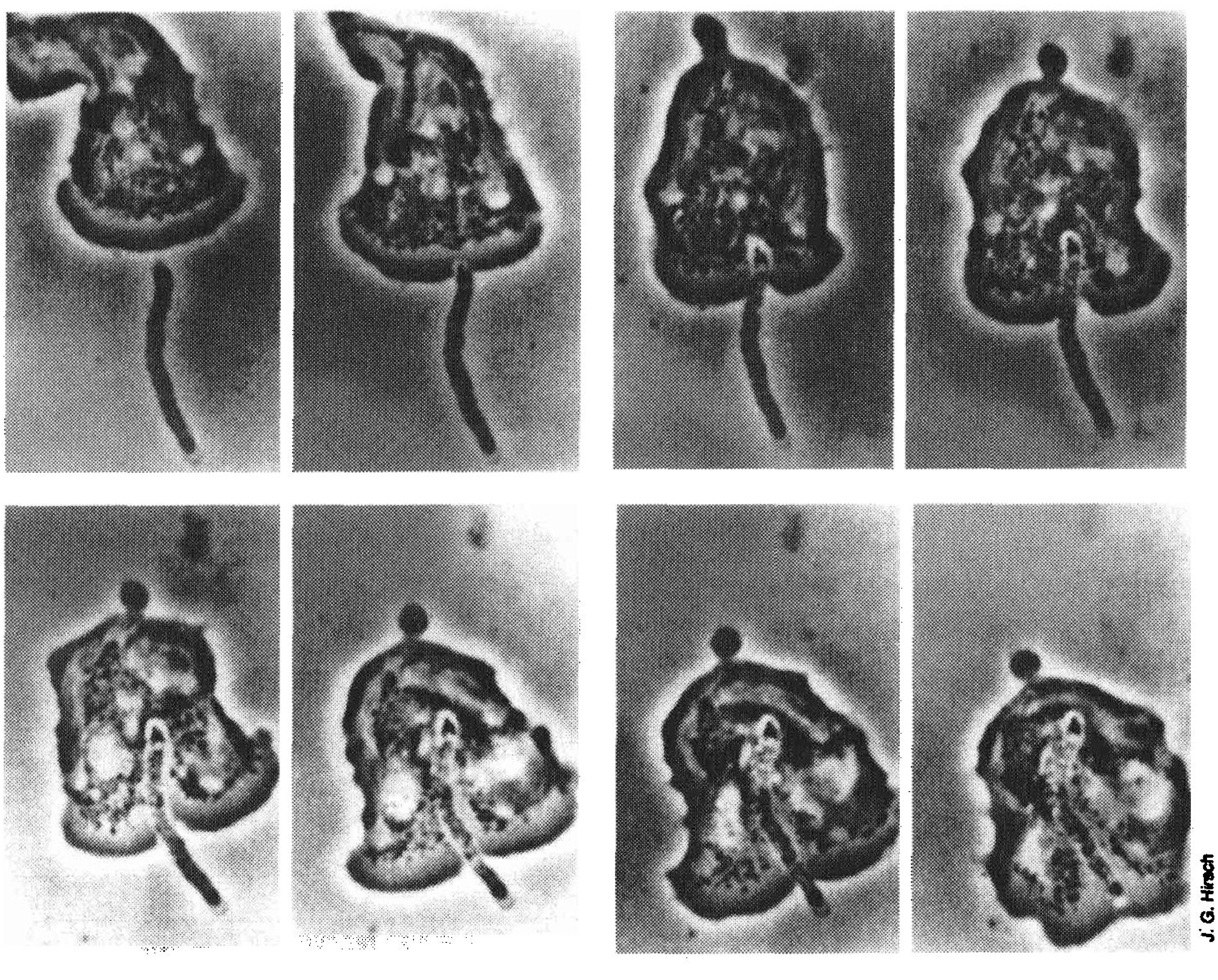
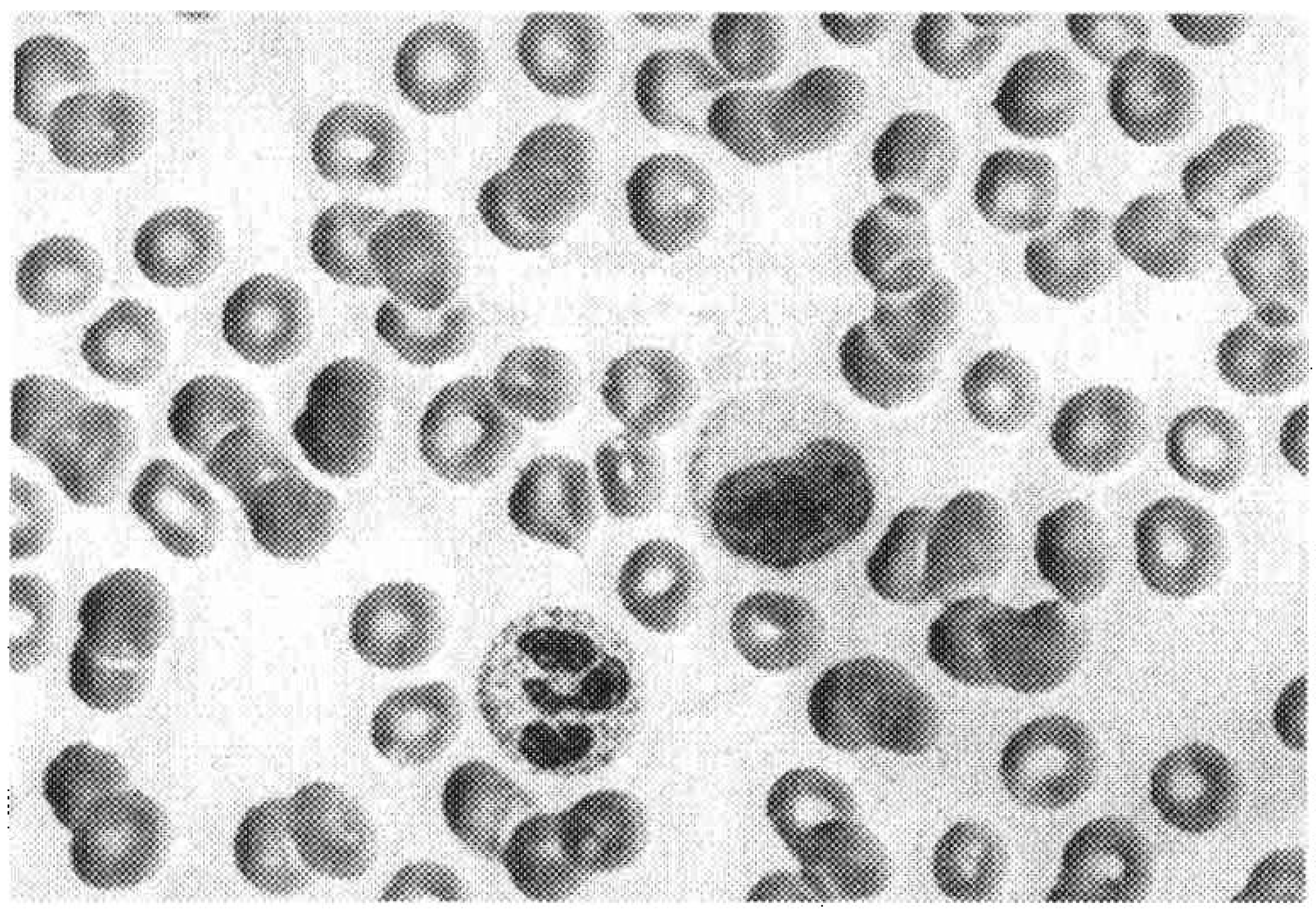
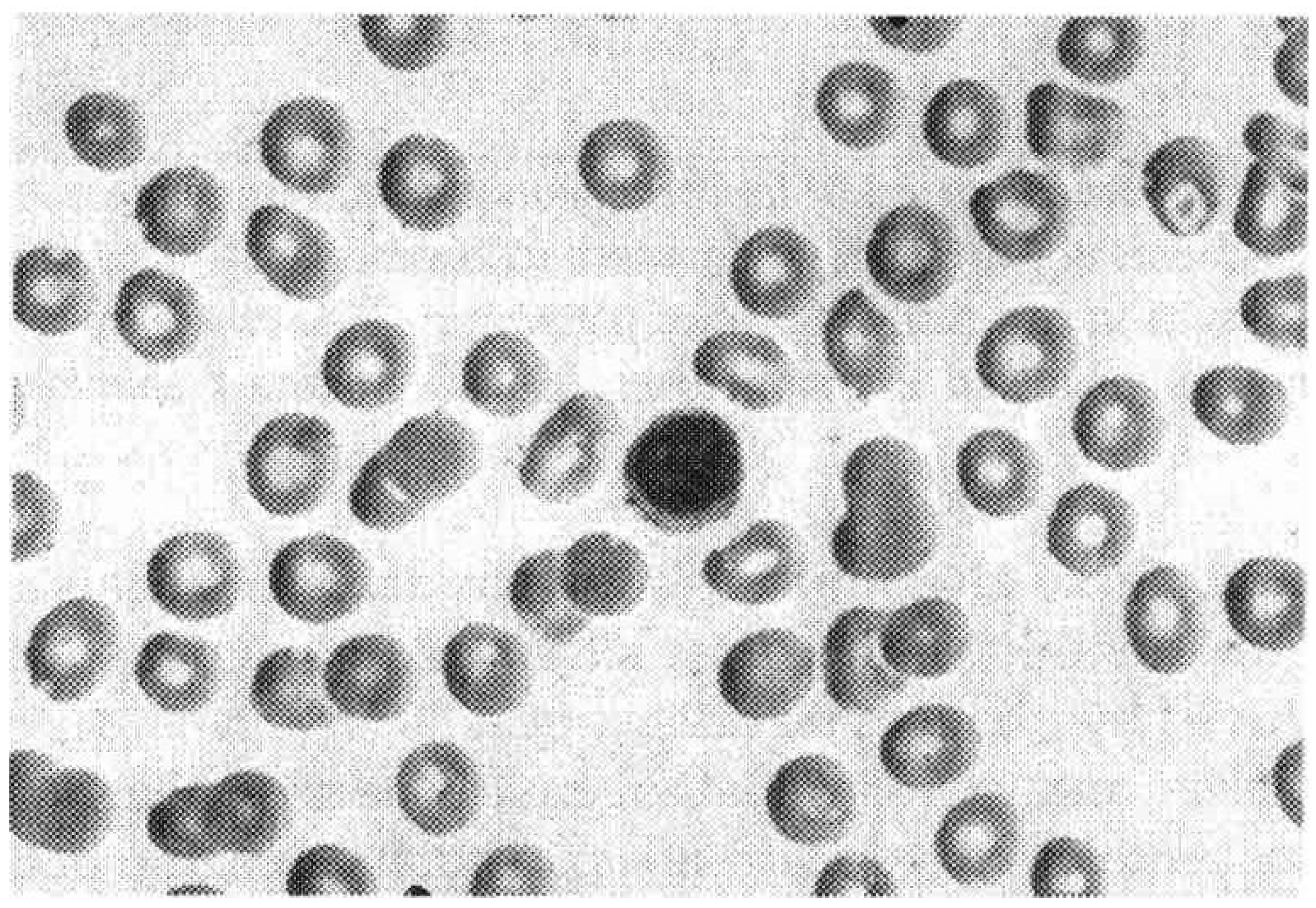


图 22.3　吞噬作用。用相差显微镜拍摄的人巨噬细胞吞入和消化巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）细胞链的定时显微照相，细菌链长 18～20μm。巨噬细胞是能摄取和分解病原体及其产物的一类细胞。

嗜中性粒细胞或多形核白细胞，是另一类吞噬细胞，它们是能主动运动的含有大量溶酶体的粒细胞（图 22.4a）。由髓样干细胞发育而来的嗜中性粒细胞是血液和骨髓中的主要细胞，从不同的地方移动到发生感染的组织部位。血液中或炎症部位的大量嗜中性粒细胞的存在表明感染的发生。单核细胞是巨噬细胞和树突状细胞循环中的前体细胞，是一类主要的吞噬细胞（图 22.4a 和图 22.3）。巨噬细胞是组织中的大型细胞，在淋巴结和脾脏中具有吞食和杀伤大多数病原体和抗原的能力，而且能与淋巴细胞相互作用并诱导获得性免疫应答。巨噬细胞是重要的 APC，能呈递抗原肽给 T 细胞，这是发生获得性免疫反应的第一步。树突状细胞（像树样的细胞）（图 22.1）也是免疫应答中的吞噬细胞，和巨噬细胞一样由前单核细胞分化而来。树突状细胞也存在于淋巴结和脾脏中，作为抗原呈递细胞。巨噬细胞和树突状细胞的特异性抗原递呈功能使得它们对诱导获得性免疫应答非常重要。APC 我们将在第 22.5 节中专门介绍。



(a)



(b)

图 22.4 免疫细胞的主要类型。（a）吞噬细胞，左下方有核细胞是嗜中性粒细胞（PMN），其特征是具有分裂开的核和颗粒内含物。在 PMN 的偏右上方的有核细胞是一个单核细胞，吞噬细胞的直径为 12～15μm，无核的红血细胞直径大约为 6μm。（b）有核细胞为循环中的淋巴细胞。淋巴细胞大多有不可见的细胞质，比吞噬细胞小，直径约为 10μm。

吞噬细胞和病原体的识别

吞噬细胞具有普通的病原体识别系统以触发适度的炎症反应。这个系统包括几种进化保留下来的模式识别分子（pattern recognition molecular，PRM）。PRM 是吞噬细胞膜链蛋白，负责识别病原体的相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）（图 22.5）。PRM 首先在果蝇（*Drosophila*）中发现，称为 Toll 样受体（Toll receptor）。人吞噬细胞表面的每一个 Toll 样受体（Toll like receptor，TLR）识别一种特异性 PAMP。例如，TLR-4 识别存在于所有 G^- 细菌细胞膜上的脂多糖（lipopolysaccharide，LPS），诱导对所有革兰氏阴性病原体一定水平的免疫。其他的 TLR 识别 PAMP，如酵母菌的表面成分（酵母多糖）、肽聚糖、细菌中的未甲基化的 CpG 寡核苷酸和细菌肽聚糖（见 23.1 节）。

PAMP 与吞噬细胞 PRM 的相互作用触发了跨膜信号，启动了信号转导作用（见 8.2 节），导致吞噬细胞的活化。这些病原体诱导信号提高了吞噬细胞的吞噬和杀伤能力。下面我们将重点介绍吞噬细胞导致病原体死亡的有毒氧化物的产生过程。

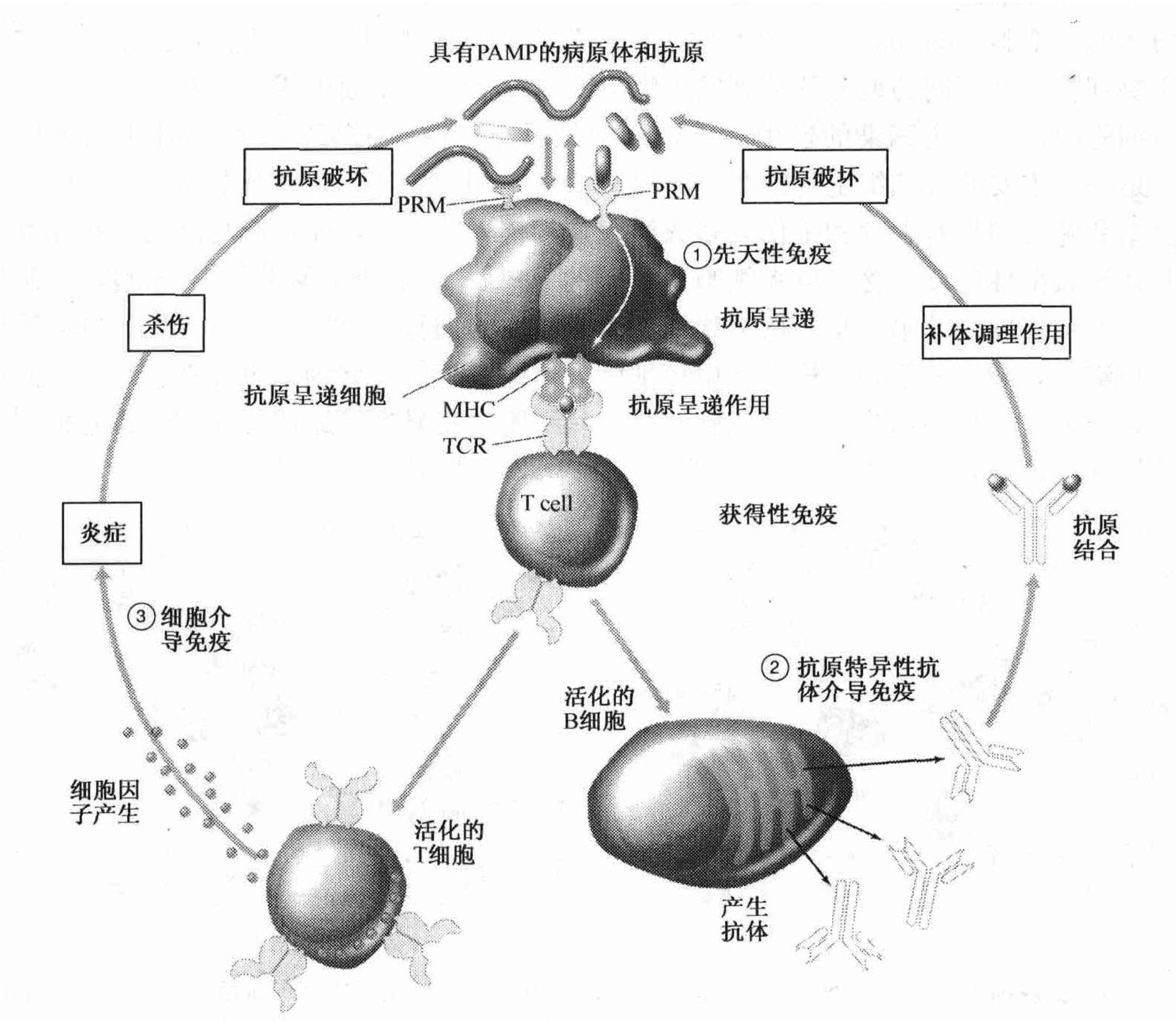


图 22.5 免疫应答综述。病原体被 3 种机制杀灭。①由病原体表面成分 PAMP 和吞噬细胞上的 PRM 相互作用而引起的先天免疫，由抗原特异性 T 细胞引起的获得性免疫有两种不同的效应途径。② 抗体介导免疫，由抗原激活的 B 淋巴细胞产生可溶性的抗原特异性抗体引起的。③ 由抗原特异性效应 T 细胞介导的细胞免疫。

氧依赖性吞噬细胞活性

病原体的摄入活化了吞噬细胞，提高了其吞噬和杀伤能力。正如在 6.15 节中讨论过的一样，多种反应都可能导致有毒含氧化合物的形成。包括过氧化氢（H_2O_2）、超氧负离子（O_2^-）、游离羟基（OH ·）、单态氧（$^1O_2$）、次氯酸（HClO）和氮氧化物（NO）。吞噬溶酶体中的酸性条件有助于毒性化合物的产生和活化。吞噬细胞正是利用了这些有毒的氧化物杀伤吞入的细菌。这些氧依赖型吞噬细胞酶结合在一起形成了足够的有毒氧化物，通过氧化细胞壁的关键结构杀死吞入的细菌。虽然这些反应发生在吞噬细胞的内部，但这些有毒氧化物并不损伤吞噬细胞本身。吞噬细胞氧介导的杀伤力总结在图 22.6 中。活化的吞噬细胞在短时间内必须摄入比通常情况下更多的 O_2，用来产生这些有毒化合物。活化的吞噬细胞提高摄氧速率称为呼吸暴发（respiratory burst）。

抑制吞噬细胞作用

有些病原体具备某些机制以中和吞噬细胞产生的毒素，或者杀伤吞噬细胞，或逃避吞噬作用。例如，金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）产生的类胡萝卜素（carotenoid）物质，可以中和单态氧以防止杀伤。胞内病原体，如结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）（引起结核病）就生长存活在吞噬细胞内（见 26.5 节）。它们似乎是利用其细胞壁肽聚糖（见 12.23 节）来破坏有毒氧化物。肽聚糖能去除游离羟基、超氧负离子等由吞噬细胞产生的致命性有毒化合物。

有些胞内的病原体能产生杀吞噬细胞蛋白质，称为杀白细胞素（leukocidin）。这种情况下，和通常一样病原体首先被吞入，杀白细胞素会杀死吞噬细胞，然后病原体再被释放出来。酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）和金黄色葡萄就是杀白细胞素的主要产生者，死亡的吞噬细胞增加了更多的脓液（pus）物质。因此把产生杀白细胞素的微生物称为化脓菌（pyogenic）。由化脓菌引起的局部感染经常发生发热和脓肿（见 26.9 节）。

微生物对抗吞噬细胞作用的另一个重要的机制是细菌的荚膜（见 4.10 节）。具有荚膜的细菌，对吞噬作用常有很高的抗性，很显然是因为荚膜的存在，防止了吞噬细胞对菌体细胞的黏附。荚膜抗吞噬的最明显例子是肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）。当用肺炎链球菌感染小鼠时，注射不足 10 个细胞，不到 5d 时间就能导致小鼠死亡；相反无荚膜的突变株则完全没有致病性（图 21.16），除荚膜以外的其他表面成分也可抑制吞噬作用。例如，酿脓链球菌产生一种特殊的物质称为 M 蛋白（见 26.2 节），

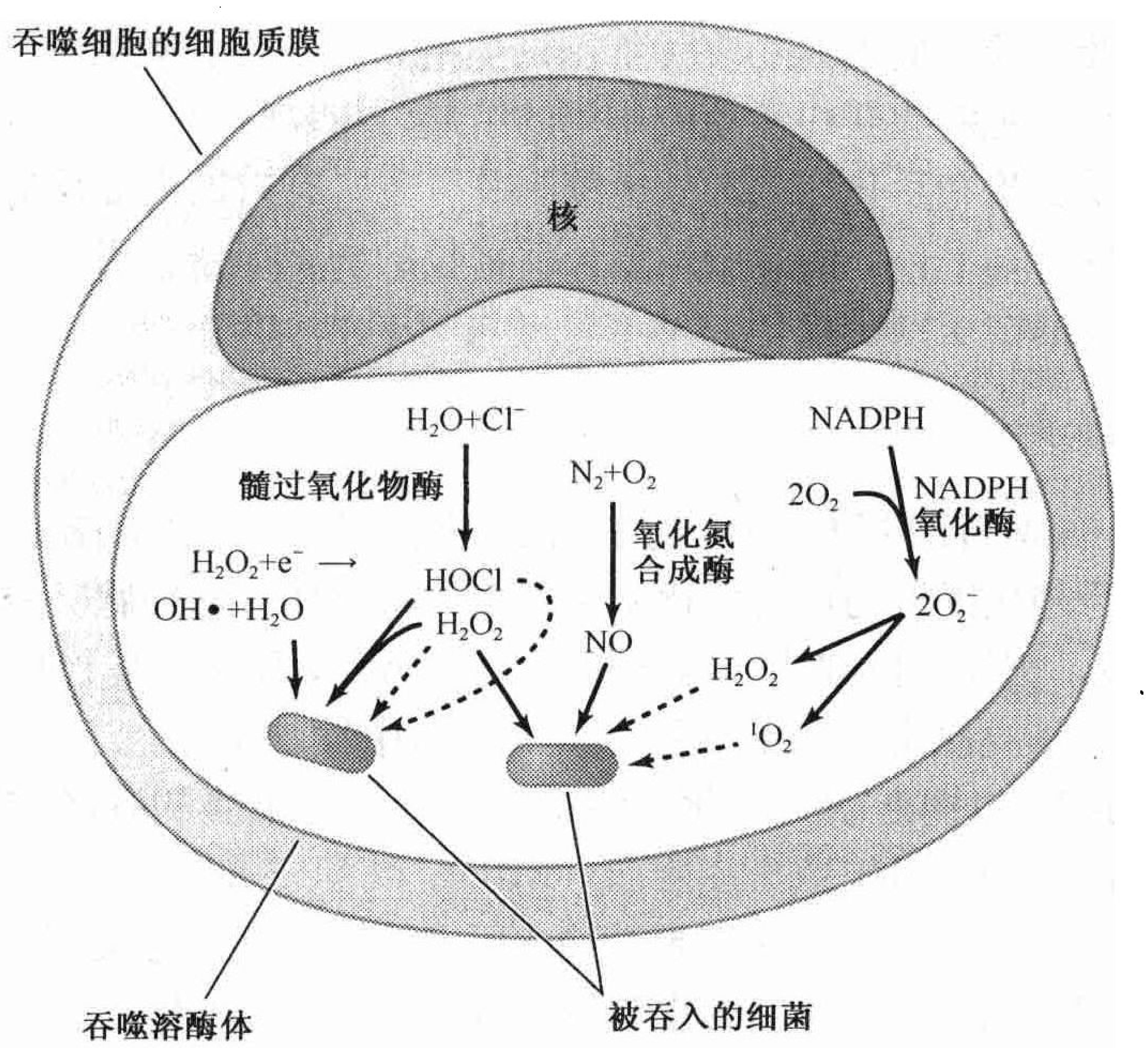


图 22.6　吞噬细胞酶在产生毒性氧化物中的作用。毒性氧化物包括过氧化氢、游离羟基、次氯酸、超氧阴离子、单态氧和氮化氧。这些毒性化合物的形成需要增加分子氧的摄取和利用。激活的吞噬细胞氧摄取和消耗的增加称为呼吸暴发。在第 6.15 节中对毒性氧的种类有更详细的讨论。

它可以改变菌体细胞的表面，抑制吞噬作用。

抗荚膜或抗细胞表面其他分子的抗体通常具有对抗细菌防卫机制的效果，以提高吞噬作用，这个过程称为调理作用（见 22.11 节）。

概念检查

先天免疫反应是由吞噬细胞介导的，吞噬细胞通过膜结合模式识别分子（pattern recognition molecular ，PRM）家族，或 PRM 识别病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）。PAMP 与 PRM 间的相互作用激活了吞噬细胞产生代谢产物，以杀死病原体或限制其影响。相反很多病原体也形成了抑制吞噬细胞的多种机制。

- 描述 PAMP 和 PRM 的分子特异性和在细胞上的定位。
- 解释活化的吞噬细胞中发生的呼吸暴发，并了解其毒性氧产物。
- 例举至少一种病原体抑制吞噬作用的机制。

22.3 炎症、发热和败血性休克

炎症（inflammation）是对有害刺激如毒素和病原体的非特异性反应。炎症常在感染部位发生红斑（erythema）、肿胀（swelling 或水肿 edema）、疼痛（pain）和发热（heat）[发烧（fever）]。炎症的分子介质包括细胞因子（cytokine）和趋化因子（chemokine）等一组蛋白质。它们是由多种细胞产生的，特别是吞噬细胞（见 22.1 节）。

炎症通常是先天免疫或获得性免疫作用的结果，免疫的两个分支诱导相同的炎症介质，这些炎症介质募集和活化相同的效应细胞和分子。有效的炎症反应常隔离和限制组织损伤，消除入侵的病原体，但也会造成炎症部位的细胞损伤。当然在某些情况下，炎症会引起相当严重的宿主细胞损伤。

炎症细胞和局部炎症

首先到达感染或组织损伤部位的炎症细胞是嗜中性粒细胞（neutrophil）（图 22.7a），一类称为趋化因子的可溶性化学引诱剂，将这些吞噬细胞吸引到感染或损伤部位（见 23.11 节）。例如，白细胞介素 8（interleukin-8，IL-8）是趋化因子家族中的一个小分子蛋白质，是由损伤的宿主细胞产生的。嗜中性粒细胞与 IL-8 相互作用被活化并向分泌 IL-8 的细胞方向运动，活化的嗜中性粒细胞是重要的吞噬细胞。同样趋化因子也募集巨噬细胞，如巨噬细胞炎症蛋白（MIP-α 和 MIP-β）（图 22.7b）。这些趋化因子是巨噬细胞的引诱剂，使得巨噬细胞沿趋化因子浓度梯度向感染部位的嗜中性粒细胞方向移动。巨噬细胞依次被活化，为提高吞噬能力（见 22.2 节）进一步分泌多种可活化其他种类细胞的可溶性细胞因子（见 23.11 节）。主要的巨噬细胞因子包括炎症反应中的肿瘤坏死因子、IL-1、IL-6 和 TNF-α（tumor necrosis factor-alpha）。由受损细胞和吞噬细胞释放的这些细胞因子和其他种类的可溶性介质促成炎症反应。例如，上述 3 种因子都可以增加血管的通透性，增大红肿的体积，引起红斑和炎症部位的发热，红斑

刺激局部神经引起疼痛。

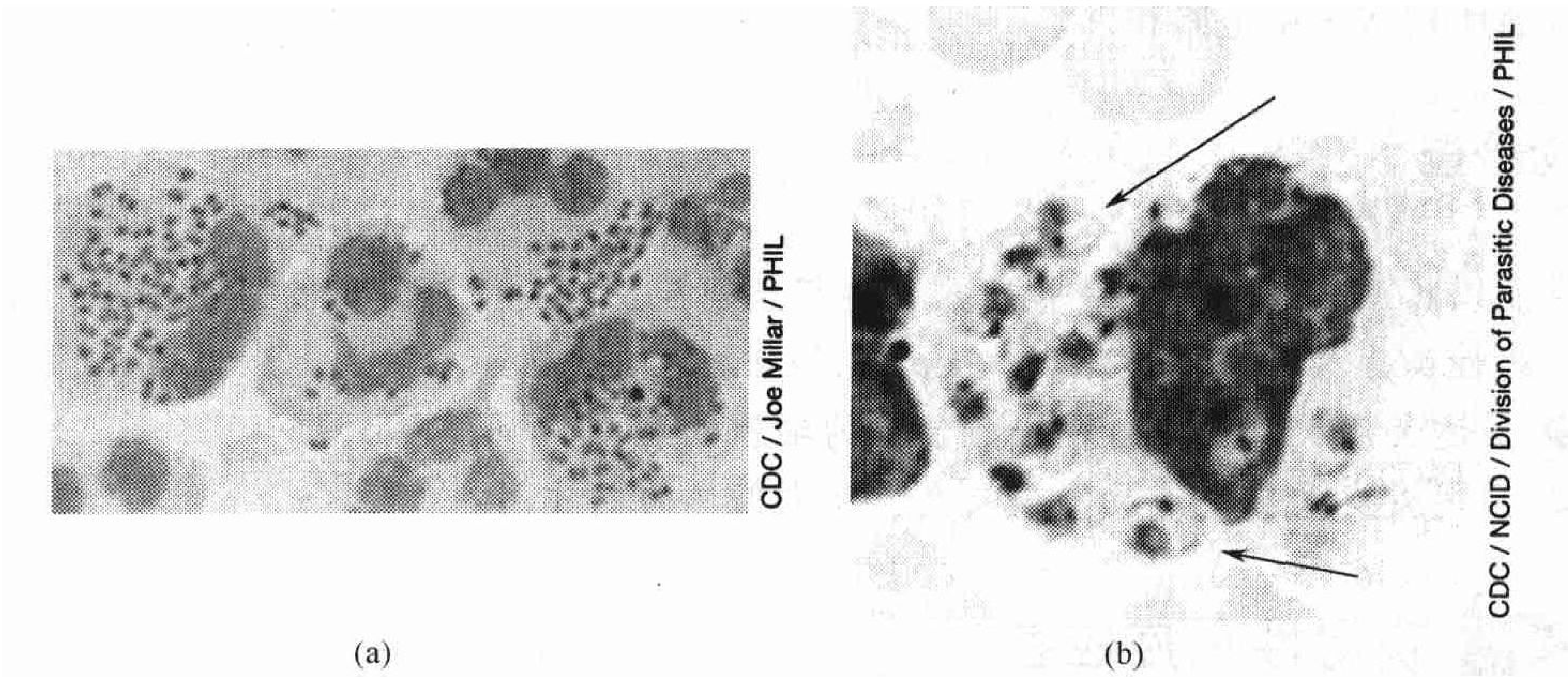


图 22.7　活化的吞噬细胞。(a) 活跃的嗜中性粒细胞正在吞噬和杀伤淋病奈瑟氏菌（*Neisseria gonorrhoeae*)。嗜中性粒细胞的直径为 10～15μm，注意每个细胞中分裂开的核及吞噬的菌体。(b) 吞噬了大量利氏曼原虫（*Leishmania*）的巨噬细胞。活化的巨噬细胞能够杀伤这些胞内寄生的原生动物。

快速的局部反应以及嗜中性粒细胞和巨噬细胞对病原体的破坏，通常引发炎症反应。随着病原体的破坏，炎症细胞不再被刺激，炎症细胞数量减少，细胞因子产生也随之降低，炎症消退。巨噬细胞除了在先天免疫中的作用以外，也可以参与获得性免疫应答。它们具有抗原呈递细胞的能力，并分泌细胞因子吸引 T 细胞，然后呈递抗原给 T 细胞（见 22.5 节)。

系统性炎症和败血性休克

有时候炎症反应无法战胜局部的病原体，致使炎症细胞及介质大量活化，炎症反应也随之被扩散，系统炎症反应就会通过循环和淋巴系统而扩展，扩散的炎症细胞和介质可能导致败血性休克（septic shock)，最终会威胁生命安全。最普通的败血性休克就是由革兰氏阴性细菌［如沙门氏菌属（*Salmonella*）或大肠杆菌（*Escherichia coli*)］引起的系统感染，由于肠道的破裂和遗漏，大量的革兰氏阴性细菌释放到腹腔、膜腔和血流中，初次感染通常可以由吞噬细胞将病原体清除，或通过抗体成功地控制。然而，由病原体带来的外膜内毒素脂多糖与吞噬细胞上的 TLR-4 相互作用并诱导 IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF 等可引起炎症的细胞因子，这些因子被释放到系统循环中，诱导多种抗病原体反应。例如，IL-1、IL-6 和 TNF-α 是内源性热原物质（endogenous pyrogen)，可以通过刺激脑内前列腺素的释放而引发高热的发生。在肝中炎症细胞因子会诱导急性期蛋白质（acute phase protein）的产生。它们包括 C 反应蛋白、补体（complement）蛋白、血清淀粉状蛋白、甘露聚糖结合性凝集素和纤维蛋白原。这些蛋白质可提高吞噬的作用导致病原体的破坏。

然而系统性炎症反应可能会有严重的后果。例如，大量内源性热原物质的释放，会引发不可控制的高热而不是局部发热；同样的机制，也会由于血管舒张和通透性增加引起中心血管组织中块状物流出，而导致血压降低和外周组织红肿。由此引起的以灾难性

的高热及血容量流失为特征的败血性休克，其死亡率高达3%以上。无法控制的系统性炎症可能比初次感染危险得多。

概念检查

炎症以疼痛、红斑，红肿和发热为特征。炎症反应是免疫应答常见的结果，不可控制的系统性炎症称为败血性休克（septic shock），可能导致严重的疾病和死亡。

◆ 描述炎症反应发生过程中所包括的细胞的种类。

◆ 描述炎症反应中涉及的分子介质及它们各自的作用。

22.4 获得性免疫应答

获得性免疫应答（adaptive immune response）或称特异性免疫应答（specific immune response）的全部内容概况在图22.5中。不仅吞噬细胞（如巨噬细胞和树突状细胞），而且B细胞都可摄取和消化病原体，这些细胞都是抗原呈递细胞（antigen-presenting cell，APC），它们的功能是将加工过的肽抗原呈递给T细胞。T细胞通过位于其表面的抗原特异性T细胞受体（T-cell receptor，TCR）识别抗原。每个T细胞表面的TCR和单一肽抗原（single peptide antigen）特异性相互作用，有些T细胞［如T_C（细胞毒性T细胞）］可直接攻击破坏抗原携带细胞。抗原活化的其他T细胞（如辅助性T_H1）通过分泌细胞因子间接发挥作用，这些细胞因子可活化其他细胞（如巨噬细胞）去杀伤抗原携带细胞。这种细胞介导免疫（cell-mediated immunity，CMI）通过识别存在于被感染宿主细胞上的病原体抗原杀伤被感染细胞。

另一类T细胞（如T_H2细胞）与抗原特异性B淋巴细胞相互作用，并刺激B细胞产生抗体（antibody）［也称免疫球蛋白（immunoglobulin ，Ig）］，每个B细胞和它产生的抗体特异地针对某一个抗原。抗体是存在于循环系统和体液中的可溶性蛋白质，能中和抗原或破坏抗原，抗体介导的体液免疫（humoral immunity）在抗血液和淋巴中病原体（如病毒和细菌），或者抗可溶性病原体产物（如毒素）方面是非常有效的。

如果说先天免疫以直接针对所有病原体为特征，那么特异性免疫则是直接与特定的大分子相互结合，以具有特异性、记忆性和耐受性为特征。

特异性

抗原-抗体或抗原-T细胞相互作用的特异性与我们讨论过的宿主先天性防御机制不同。宿主的先天性反应事实上可以阻挡任何侵入的微生物，甚至那些宿主以前从未遇见过的病原体。在获得性免疫应答中，免疫力不可能在第一次接触病原体的几天内就产生。然而，获得性免疫一旦触发，通过识别特定的抗原分子特征，特异性直指相应的病原体。

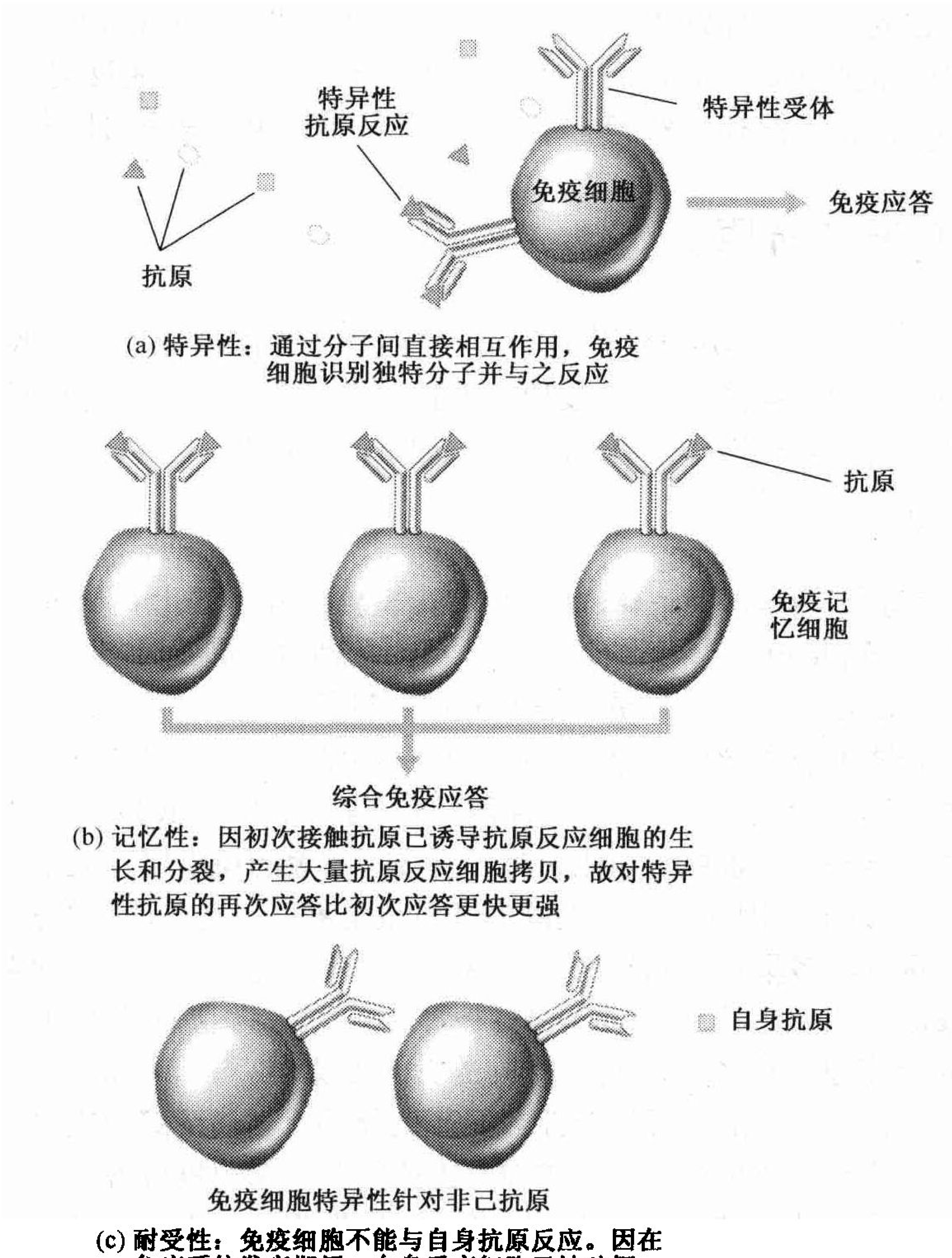
记忆性

一旦免疫系统产生抗原特异性抗体或T细胞，当再次接触到同一微生物刺激时，

会迅速产生大量的抗原反应性 T 细胞或免疫球蛋白。这种再次对同一病原产生更快速更强烈应答的能力称为免疫记忆（图 22.8b），免疫记忆使得宿主可特异性抵抗以前接触过的病原体引起的疾病。我们可以通过免疫接种（immunization）提高免疫记忆，用杀死或弱化的病原体及其产物接种易感的人体，采用人工刺激可以提高对大多数危险病原体的免疫能力（见 22.11 节）。

耐受性

耐受是指由机体获得的对自身抗原的特异性无应答能力。对宿主体内所有大分子和潜在的抗原耐受是必须的。因此免疫系统必须不识别宿主自身的大分子物质，因为如果它们被抗体分子或者 T 细胞识别，宿主细胞将被破坏（图 22.8c）。同时，获得性免疫应答要有能力辨别外来抗原（非己危险的）和宿主抗原（自身无害的）并做出适当的反应。



(c) 耐受性：免疫细胞不能与自身抗原反应。因在免疫系统发育期间，自身反应细胞已被破坏

图 22.8　获得性免疫应答。图示抗体介导和细胞介导免疫的关键特征。

概念检查

非特异性吞噬细胞呈递抗原给特异性 T 细胞，激发效应 T 细胞和抗体的产生。T 细胞和抗体直接或间接与抗原反应，以中和或破坏抗原。获得性免疫应答的 3 大特征：对抗原的特异性，再次接触同一抗原的记忆性和区别自己和非己抗原的耐受性。

◆ 描述细胞介导和抗体介导免疫应答中都包括哪些抗原特异性细胞。

◆ 特异性、记忆和耐受性的破坏会对病原体应答能力产生怎样的影响。

Ⅱ 抗原、T 细胞和细胞免疫

获得性免疫应答包括识别多种多样的病原体来源的分子和结构，获得性免疫应答所识别的抗原分子首先被抗原特异性 T 细胞识别。这里，我们首先讨论抗原，然后集中讨论 T 细胞识别，包括抗原特异性反应，如细胞介导的杀伤、炎症反应及对 B 细胞产生抗体提供帮助等。如果没有 T 细胞的存在，抗原特异性免疫是不可能发生的。

22.5 免疫原和抗原

抗原是能与抗体和 T 细胞受体（TCR）反应的物质。能诱导免疫应答的抗原是免疫原（immunogen），大多数抗原是免疫原，但抗原不都是免疫原。这里我们将解释免疫原的特性，然后阐述与抗体和 TCR 相互作用的抗原的特性。

免疫原的内在性质

所有的免疫原必须满足能被抗体和 TCR 有效识别的几个标准，免疫原必须在大小(size)、复杂性（complexity）和形状（form）等内在性质上满足最低的要求。

分子的大小（molecular size）是免疫原的重要特征。例如，称为半抗原（hapten）的低分子质量化合物不能诱导免疫应答，但能与抗体结合。因为半抗原能与抗体结合，所以它们是抗原但不是免疫原。半抗原包括糖类、氨基酸以及低分子质量的有机化合物。当半抗原被连接到大的蛋白质载体上时，就成了有效的免疫原。大多数免疫原的分子质量在 10 000Da 以上。因此，足够大的分子质量是潜在的免疫原性的标志。

复杂的、非重复的多聚物（如蛋白质）通常是有效的免疫原。复杂的碳水化合物也是很有效的免疫原；相反，核酸、简单的多糖和脂类，因为它们是由重复的单体组成的，所以它们的免疫原性很差。因此，物质的分子复杂性（molecular complexity）是免疫原性的另一个指标。不溶性或聚合性的复杂大分子（如热沉淀的蛋白质）通常是非常好的免疫原，不溶性物质更容易被吞噬细胞迅速捕获引起免疫应答；相反，可溶形式的相同分子由于不容易被吞噬细胞捕获，因此免疫原性很差。由此可见，适当的物质形状（physical form）也是免疫原性的另一个条件。

免疫原的外在性质

尽管很多物质具有潜在的免疫原性，但外在因素也同样会影响免疫原性，包括免疫

原的剂量、引入途径以及相对宿主来说的外源性。

免疫原进入宿主的剂量（dose）对有效的免疫应答也很重要，但较宽的剂量范围通常可提供满意的免疫能力。一般来说，在大多数哺乳动物中，有效的剂量范围为 10μg～1g，剂量高于 1g 或低于 10μg 可能无法刺激免疫应答。过高或过低的剂量可能会引起意外的特异性免疫应答和耐受。

同时免疫原的引入途径（route）也很重要。一般采用胃肠以外的免疫接种途径，通常为注射接种，它比体表接种或口服更有效。当采用口服或体表途径时，抗原在和吞噬细胞接触前可能会发生分解。

另外免疫原最后和最重要的外在特性就是有效的免疫原性，对宿主来说抗原必须是外源性的。获得性免疫系统只识别和清除外来非己的抗原，不识别自身抗原，对自身分子耐受（tolerant）。同种动物的不同个体间相同的分子都可能成为免疫原。

抗原与抗体及 T 细胞受体的结合

抗体或 TCR 不与整个抗原大分子相互作用，而是只同抗原决定簇（antigen determinant）或表位（epitope）的抗原分子的独特部位相结合（图 22.9）。抗原决定簇可以是糖、氨基酸和其他有机分子。

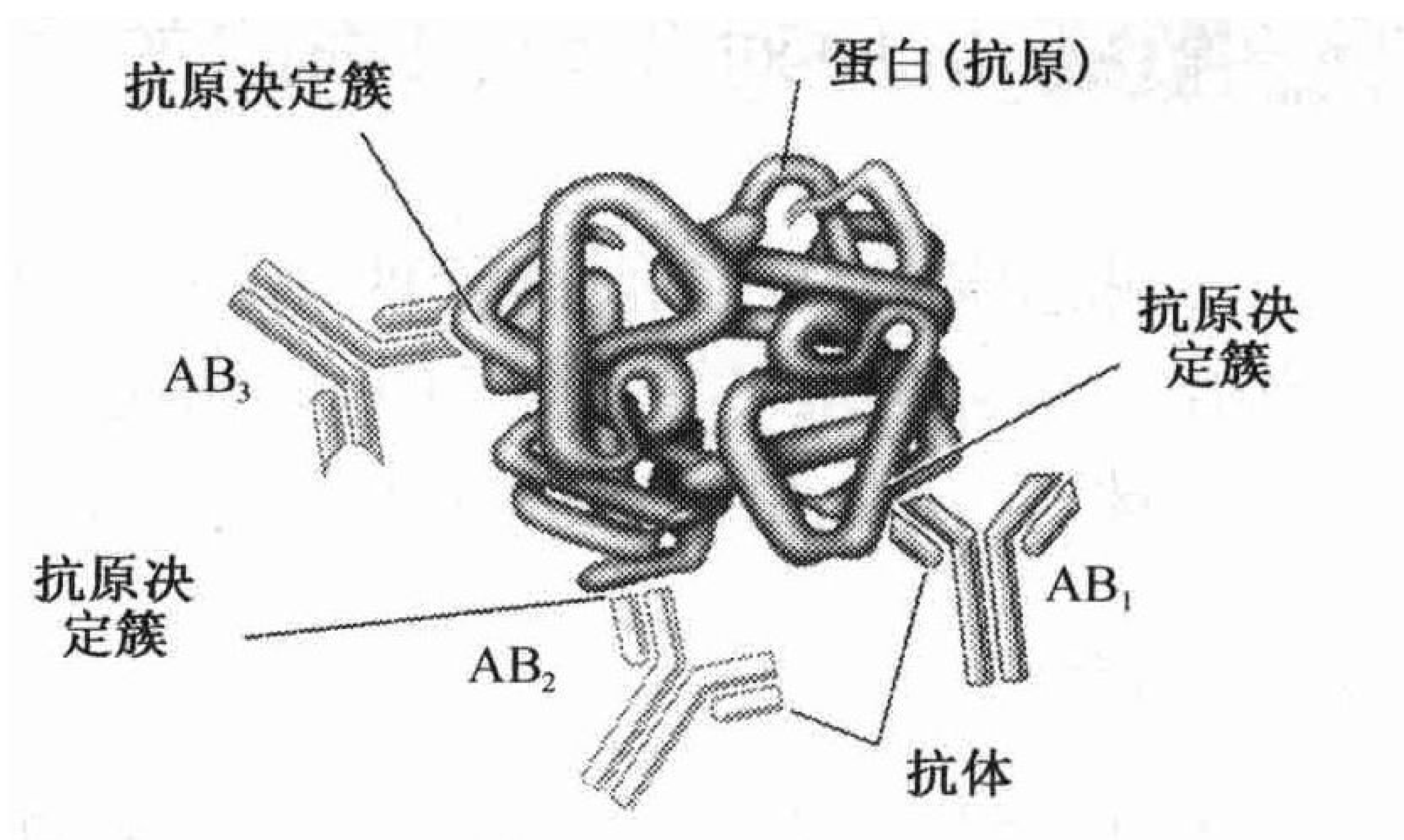


图 22.9　抗原和针对抗体的抗原决定簇。抗原可以含有几个不同的抗原决定簇，每一个都能和特异性抗体反应，由 AB_1 识别的抗原决定簇是一个构象决定簇，由同一个肽链的不同的两部分组成。肽链折叠使得蛋白质分子上相距较远的两部分凑在一起构成了一个决定簇。

抗体只与抗原表面易接近的表位相互作用。就蛋白质而言，4～6 个氨基酸序列是抗原决定簇最适合的大小。蛋白质通常含有几百甚至几千个氨基酸，因此，可能出现抗原表位的交叉重叠。有些氨基酸组成的表位，就一级结构而言，氨基酸是远距离的；但由于抗原大分子的二级、三级甚至空间结构使得这些远离的氨基酸聚在一起（图 22.9，见 3.7 节和 3.8 节），这些构象决定簇增加了大分子抗原的复杂性。细菌细胞或病毒表面由蛋白质、多糖或其他大分子镶嵌而成，所有这些成分都有其独特的表位。因此，一个典型的微生物甚至一个大分子的抗原组成都是相当复杂的。

抗体通常只识别暴露在大分子表面的表位，而 TCR 只识别部分被降解后的免疫原的表位。这种降解或加工过的抗原首先要呈现在 ACP 或靶细胞表面，然后再呈递给 T 细胞（见 22.5 节和图 22.12）。抗原的加工通常会破坏抗原的构象结构，因为抗原一般被加工成少于 20 个氨基酸的多肽。正由于这个原因，T 细胞一般识别线性决定簇（linear determinant），而抗体识别的是构象决定簇。

抗体或 T 细胞的特异性是相当敏感的，足以区分非常接近表位之间的差别。例如，抗体能够识别葡萄糖和半乳糖，而这两个糖只有一个羟基的构象不同。然而，特异性也不是绝对的，一个独特的抗体或 TCR 又可以和几个不同的但结构上相似的表位反应。能诱导相同的抗体或 TCR 反应的抗原称为同种抗原（homologous antigen），只与抗体反应的非同种抗原称为异种抗原（heterologous antigen）。抗体或 TCR 与异种抗原之间

的相互作用称为交叉反应（cross-reaction）。

概念检查

免疫原是诱导免疫应答的外源大分子。分子的大小、复杂性和物理形状是免疫原的内在因素。当外来的免疫原以适当的剂量和途径引入宿主体内后，会启动免疫应答。抗原是被抗体或 TCR 识别的分子。抗体识别构象决定簇，而 TCR 识别线性肽决定簇。

◆ 如何区别免疫原（immunogen）和抗原（antigen）。

◆ 掌握免疫原需具备的内在（intrinsic）和外在（extrinsic）因素。

◆ 描述抗体表位与 TCR 表位的相同和不同之处。

22.6 抗原对 T 淋巴细胞的呈递

T 淋巴细胞通过细胞表面的 T 细胞受体（T-cell receptor，TCR）与抗原特异性相互作用，从分子水平上看，TCR 是与抗原呈递细胞或被感染的靶细胞上主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）蛋白质结合的肽抗原相互作用。

T 细胞受体

TCR 是 T 细胞表面延伸到细胞外环境的一种跨膜蛋白，在每种 T 细胞表面具有相同结构的 TCR 的每种 T 细胞有几千个拷贝。TCR 由两条链组成，一条 α 链，一条 β 链，每条肽链都有一个可变（V）区和恒定（C）区（图 22.10）。Vα 和 Vβ 区相互作用共同形成了一个完整的抗原结合位点。我们将在 23.7 节中了解到，获得性免疫能够诱导 TCR 的形成，这些 TCR 将结合几乎我们所知的每一种肽抗原。另一类抗原如复杂的多糖是不能被 TCR 识别的，但可以与 B 细胞表面的免疫球蛋白受体结合（见 22.10 节）。TCR 只能识别并结合肽抗原，而肽抗原必须首先结合到自身蛋白质的主要组织相容性复合体上。

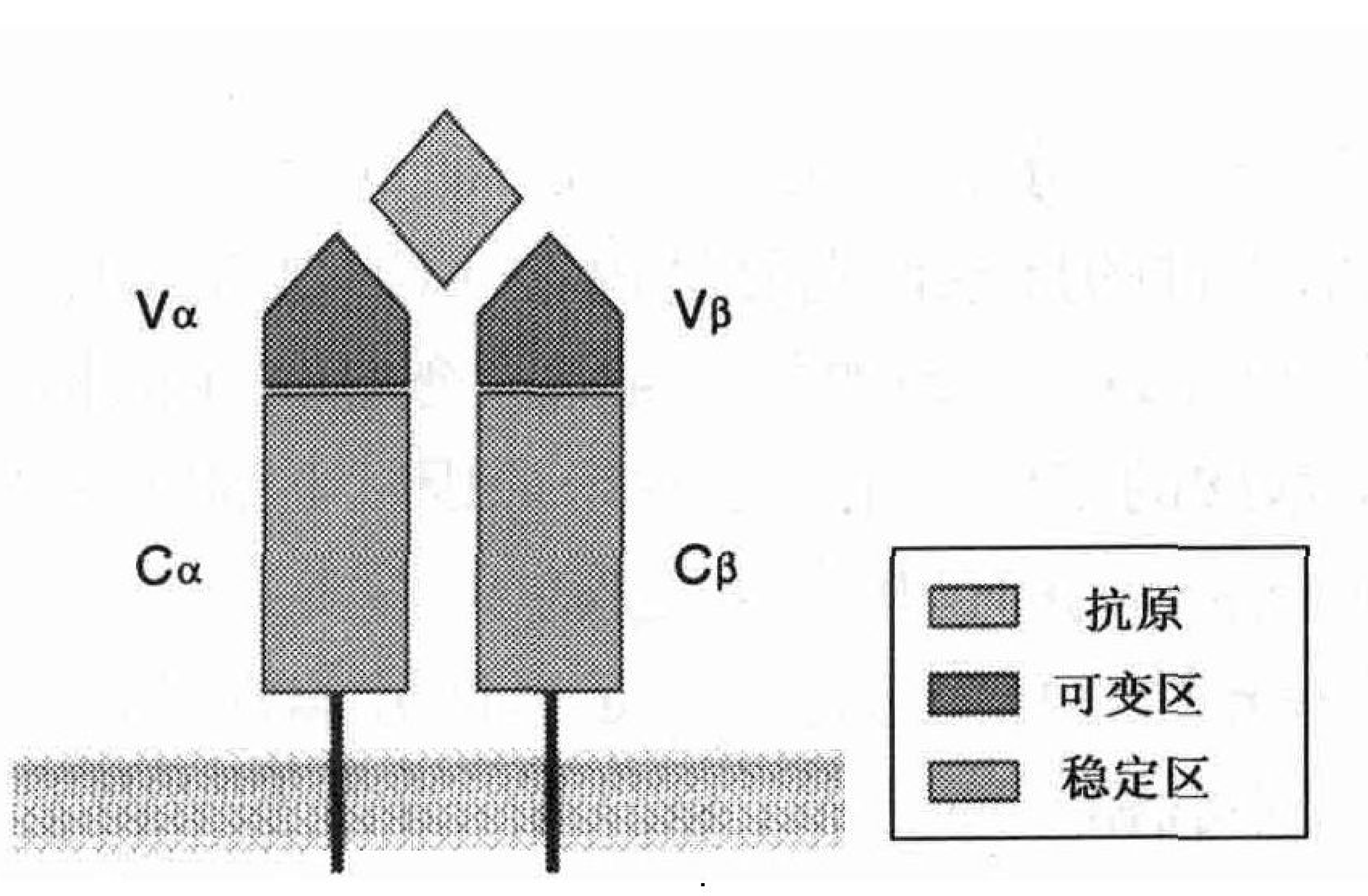


图 22.10 T 细胞受体（TCR）的结构。链和链的 V 区结合形成了肽抗原的结合位点。

主要组织相容性复合体（MHC）蛋白

MHC 蛋白由主要组织相容性复合体（MHC）的基因区所编码，MHC 蛋白存在于所有脊椎动物中。MHC 蛋白由这一复合体中数个基因产生，并统称为人白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）。MHC 蛋白是作为移植排斥反应的主要靶分子首次被发现的，当供者的组织器官移植给受者而遭到免疫排斥的时候，他们的 MHC 蛋白是不相容的。我们现在已经知道，MHC 蛋白的基本功能是作为抗原呈递分子，参与抗原和 TCR 间的相互作用。MHC 基因编码 MHC Ⅰ类蛋白（class Ⅰ MHC protein）和 MHC Ⅱ类蛋白（class Ⅱ MHC protein）。MHC Ⅰ 类蛋白存在于所有有核细胞上。而 MHC Ⅱ 类蛋白只存在于 B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞和抗原呈递细胞的表面。这些分子在不同细胞的分配与它们独特的功能是密切相关的。

MHC Ⅰ类蛋白由两条肽链组成（图 22.11a），一条 MHC 基因编码的嵌膜蛋白 α 链和一条非 MHC 编码的较小的 β 微球蛋白（beta-microglobulin，β_2m）。MHC Ⅱ类蛋白由两条非共价连接的肽链 α 链和 β 链组成，像Ⅰ类蛋白的 α 链一样，两条肽链都镶嵌在质膜上，并从细胞表面延伸到外面（图 22.11b）。

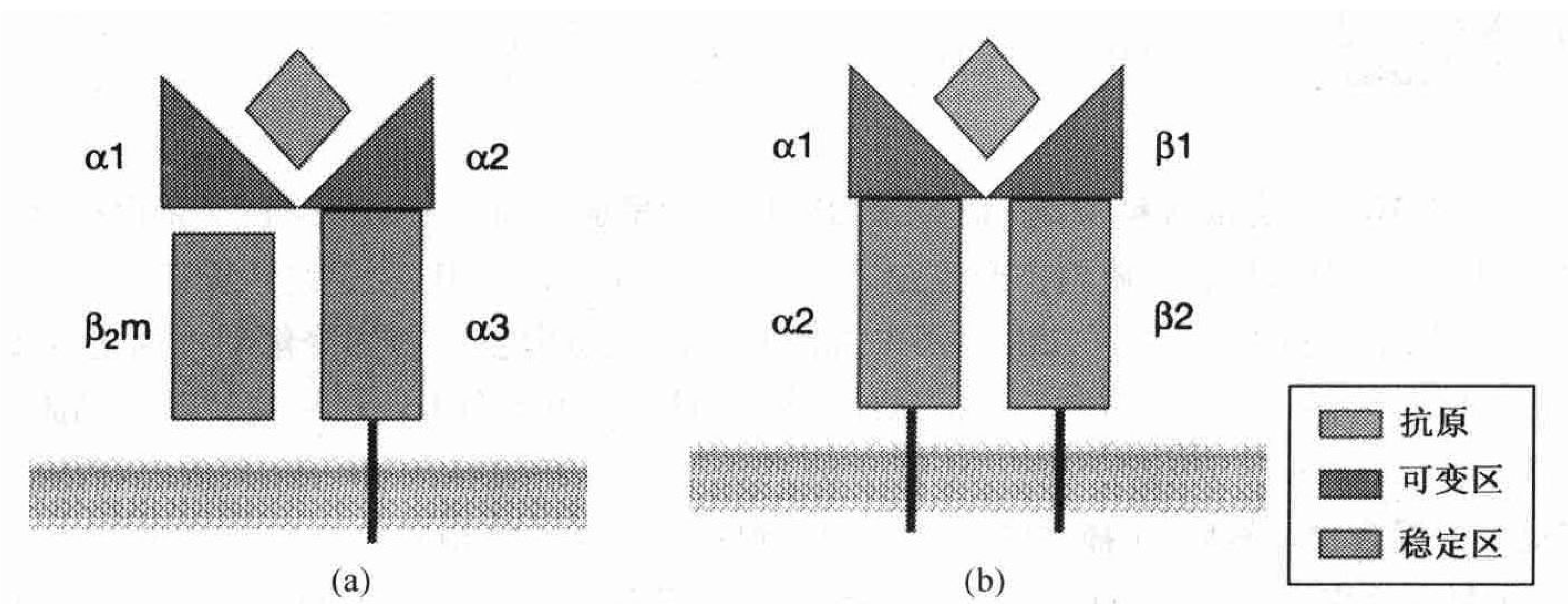


图 22.11　MHC 蛋白的结构。（a）MHC Ⅰ类蛋白 α_1 和 α_2 结构域相互作用形成肽抗原结合位点。（b）MHC Ⅱ类蛋白，α_1 和 β_1 结合形成肽抗原结合位点。

MHC 蛋白在结构上并不相同，甚至在给出的种属中，不同的个体其 MHC 蛋白的氨基酸序列也常表现出细微的差异，这些有限的序列变化称为多态性（polymorphism）。人类有数百种不同的 MHC 基因，MHC 的多态性对于从一个个体到另一个体的器官移植来说是最主要的抗原性障碍，因此 MHC 相容性不匹配的器官移植会被作为非己识别，并因此而发生排斥。有关 MHC 基因和 MHC 蛋白的详细的分子结构和编码基因将在第 23 章介绍。

抗原呈递作用

MHC 蛋白的功能是作为 T 细胞识别外来抗原的辅助分子。T 细胞不间断地检测其他细胞表面的分子概貌以鉴别这些细胞上携带的非己抗原。T 细胞上的 TCR 只与镶嵌有外来抗原的 MHC 分子结合，如果脱离了 MHC 蛋白的呈递，T 细胞则不会识别外来抗原。这是什么原因呢？通过感染和吞噬作用，宿主细胞可以捕获非己抗原，然后分解加工这些抗原并将加工过的抗原肽呈递在 MHC 蛋白中。MHC-肽复合物穿过质膜被送

出细胞呈现在细胞表面以供 T 细胞识别。现已知有两种抗原加工系统，一种是针对 MHC Ⅰ抗原的呈递，另一种是针对 MHC Ⅱ抗原的呈递（图 22.12）。

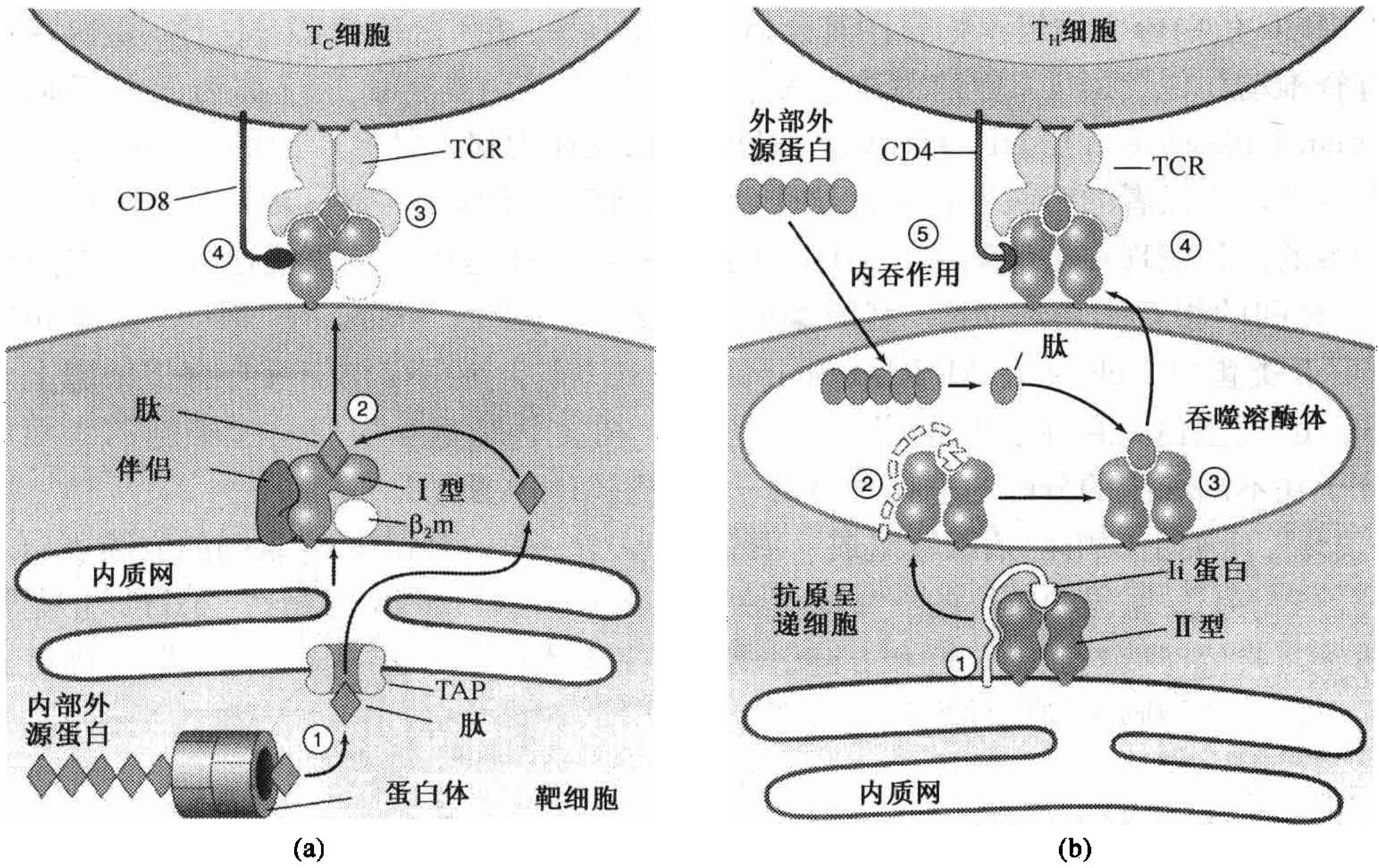


图 22.12　MHC Ⅰ 类蛋白和 MHC Ⅱ 类蛋白对抗原的呈递。（a）在 MHC Ⅰ 类蛋白抗原呈递中，MHC Ⅰ 类蛋白在内质网中产生并装配。伴侣蛋白固定 MHC Ⅰ类分子直至与抗原结合。① 胞内制造的肽抗原（如由病毒来源的）在细胞质中被蛋白体降解后，通过 TAP 蛋白形成的孔转移，穿过内质网膜；②肽结合到 MHC Ⅰ类蛋白上，然后被转移到细胞表面；③与 T_C表面的 TCR 相互作用；④T_C上的共同受体 CD8 参与 MHC Ⅰ 类蛋白的结合，形成更大的复合物，然后 T_C释放细胞因子和细胞毒素，杀伤靶细胞。对 T 细胞所识别肽-MHC Ⅰ复合物来说，任何相互作用的细胞都可作为靶细胞。（b）在 MHC Ⅱ 类蛋白抗原呈递途径中①MHC Ⅱ 类蛋白在内质网中产生，并与阻碍蛋白 Ii 装配，防止 MHC Ⅱ与内质网中的肽形成复合物；② 然后含有 MHC Ⅱ 类蛋白的溶酶体与吞噬体融合，形成吞噬溶酶体，在那里，从细胞外吞入的外源蛋白和 Ii 被降解；③ MHC Ⅱ 类蛋白结合到被降解的外源肽上，形成复合物并转移到细胞表面；④ 再与 T_H细胞上的 TCR 结合；⑤ 与 CD4 辅助受体共同作用，使 T_H细胞释放细胞因子，细胞因子作用于其他细胞，激活免疫应答，对 T 细胞识别肽-MHC Ⅱ类复合物来说只有 APC 是靶细胞。ACP 正常为巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞。

MHC Ⅰ 类蛋白呈递的肽抗原来自于病原体蛋白质，存在于非吞噬细胞的细胞质内（图 22.12a）。外源病原体蛋白质由病毒及其他胞内病原体的感染造成，如病毒感染的蛋白质，在细胞质的特殊结构——蛋白酶体（proteosome）中被摄取消化而得到。大约 10 个氨基酸长度的肽抗原经由抗原肽转运体（transporters associated with antigen processing，TAP）形成的孔，通过能量依赖反应被转运到内质网（endoplasmic reticulum，ER）中。肽一旦进入内质网，即刻与 MHC Ⅰ 类蛋白结合，被一组伴侣（chaperone）蛋白固定在 TAP 附近。这些伴侣蛋白引导 MHC Ⅰ类蛋白分子到 TAP 位点，并将其固定在那里一直到肽被结合。然后 MHC Ⅰ类蛋白-肽复合物从伴侣蛋白中释放出来，再

转移到细胞表面连接到质膜中，以供 T_C细胞识别。

由此可见，MHC 蛋白的作用是作为一平台（platform）结合外源病毒抗原。接下来，是 T 细胞表面的 TCR 与靶细胞表面的非己抗原以及自身的 MHC 蛋白之间的相互作用。T 细胞-靶细胞相互作用诱导细胞毒性 T 细胞产生一种称为穿孔素（perforin）的细胞毒性蛋白质，来杀伤病毒感染的靶细胞。

第二种抗原呈递系统包括 MHC Ⅱ 类蛋白，该蛋白质只在具有吞噬作用的 APC 中表达。在 ACP 中，MHC Ⅱ 类蛋白的功能是呈递来自消化过的胞外病原体，如细菌的肽。开始时，MHC Ⅱ 类蛋白在 ER 中装配，很像 MHC Ⅰ 类蛋白，但与 MHC Ⅰ 类蛋白不同，MHC Ⅱ 类蛋白的伴侣蛋白称作Ⅱ或不变链（invariant chain），结合到 MHC Ⅱ 类蛋白上，妨碍了 MHC Ⅱ类肽的结合点，防止 MHC Ⅱ 类蛋白与 ER 内的肽结合。这些 MHC Ⅱ-Ii 复合物能从内质网转运到液泡中（溶酶体）（见 22.2 节）。含有外来抗原的吞噬体和溶酶体融合形成吞噬溶酶体，使外来抗原及 Ii 蛋白都被溶酶体中的酶分解。当外源肽被分解到 10～15 个氨基酸（比 MHC Ⅰ 类蛋白结合肽稍大一点）后才被结合到打开的 MHC Ⅰ类抗原的结合位点，然后这一复合物将转移到细胞质膜，在那里呈递给特异性辅助 T 细胞（T_H）。T_H细胞通过 TCR 识别 MHC Ⅱ-肽复合物，它们之间的相互作用导致 T_H分泌细胞因子，并刺激特异性 B 细胞克隆产生抗体或引起炎症反应（见 22.8 节和 22.10 节）。

CD4 和 CD8 共同受体

除了 TCR，每一个 T 细胞还表达一种作为第二受体（coreceptor）的细胞表面蛋白。T_H细胞表达一个 CD4 蛋白辅助受体，而 T_C细胞表达一个 CD8 蛋白辅助受体（图 22.12）。当 TCR 结合到肽-MHC 复合物上时，T 细胞上的辅助受体也结合到 MHC 蛋白上，这增强了分子间相互作用并提高了 T 细胞的活性。CD4 只与 MHC Ⅱ 类蛋白结合，可增强 T_H细胞与表达 MHC Ⅱ 类蛋白的 ACP 相互作用；同样，CD8 只与MHC Ⅰ 类蛋白结合，提高 T_C细胞与携带 MHC Ⅰ 类蛋白的靶细胞的结合。CD4 和 CD8 蛋白被用来作为区分 T_H和 T_C细胞的标记（见 24.9 节）。

概念检查

T 细胞识别由 ACP 或由病原体感染细胞所呈递的抗原，在分子水平上，TCR 结合由 MHC 蛋白呈递的抗原肽。这些分子之间的相互作用刺激 T 细胞杀伤携带抗原的细胞或产生称为细胞因子的细胞刺激蛋白。

◆ 区分 MHC Ⅰ 类蛋白和 MHC Ⅱ 类蛋白作为细胞表面分子不同的功能。

◆ 区分胞内和胞外病原体抗原的呈递过程。

22.7 细胞毒性 T 细胞和天然杀伤细胞

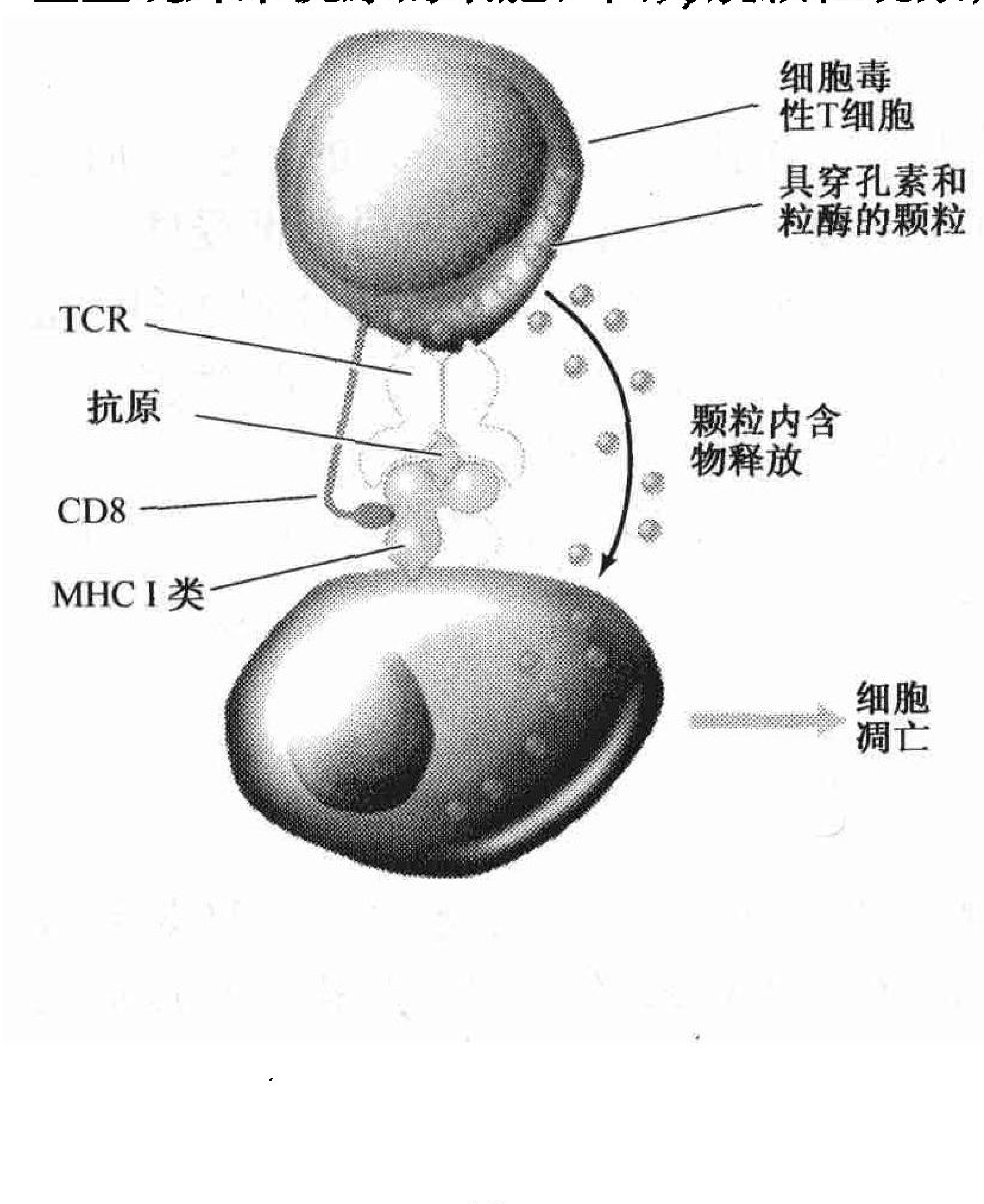
在前面的章节中，我们介绍了两个 T 淋巴细胞类群，即细胞毒性 T 细胞（T-cytotoxic cell）和辅助性 T 细胞（T-helper cell）。本节中我们将详细介绍细胞毒性 T 细胞

的杀伤功能，还将介绍一种也能识别和杀伤被胞内病原体感染的细胞的天然杀伤细胞（natural killer cell）。

细胞毒性 T 细胞

我们已经知道细胞毒性 T 细胞（T_C）就是细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte，CTL），它能直接破坏那些表面呈现外来抗原的细胞。如我们讨论过的，T_C 细胞可以识别嵌入 MHC 类蛋白中的外来抗原，当一个细胞呈现了与 MHC Ⅰ 类蛋白结合的外源抗原时（如一些病毒肽可以呈现在被病毒感染的细胞表面），这个细胞就能被 T_C细胞杀伤（见 22.6 节）。

细胞的死亡需要 T_C细胞和靶细胞之间的直接接触，细胞间的接触是由 TCR 和肽-MHC Ⅰ类复合物之间的结合开始（图 22.12）。在与靶蛋白接触过程中，T_C细胞中的颗粒移动到接触点，将颗粒中内含物释放在那里（脱颗粒），颗粒中含有穿孔蛋白，穿孔蛋白可以进入靶细胞膜中，使膜形成一个孔洞。除穿孔蛋白外，T_C细胞颗粒中还含有颗粒溶解酶，这种酶可引起细胞凋亡（apoptosis）。当颗粒溶解酶通过由穿孔蛋白制造的空洞进入靶细胞时，细胞会发生以细胞死亡和脱颗粒为特征的细胞凋亡（图 22.13a），然而 T_C细胞仍保持完好，其细胞膜并未被穿孔蛋白破坏。T_C细胞只杀伤那些呈现外来抗原的细胞，因为脱颗粒现象只发生在 T_C细胞和携带外来抗原的细胞接触



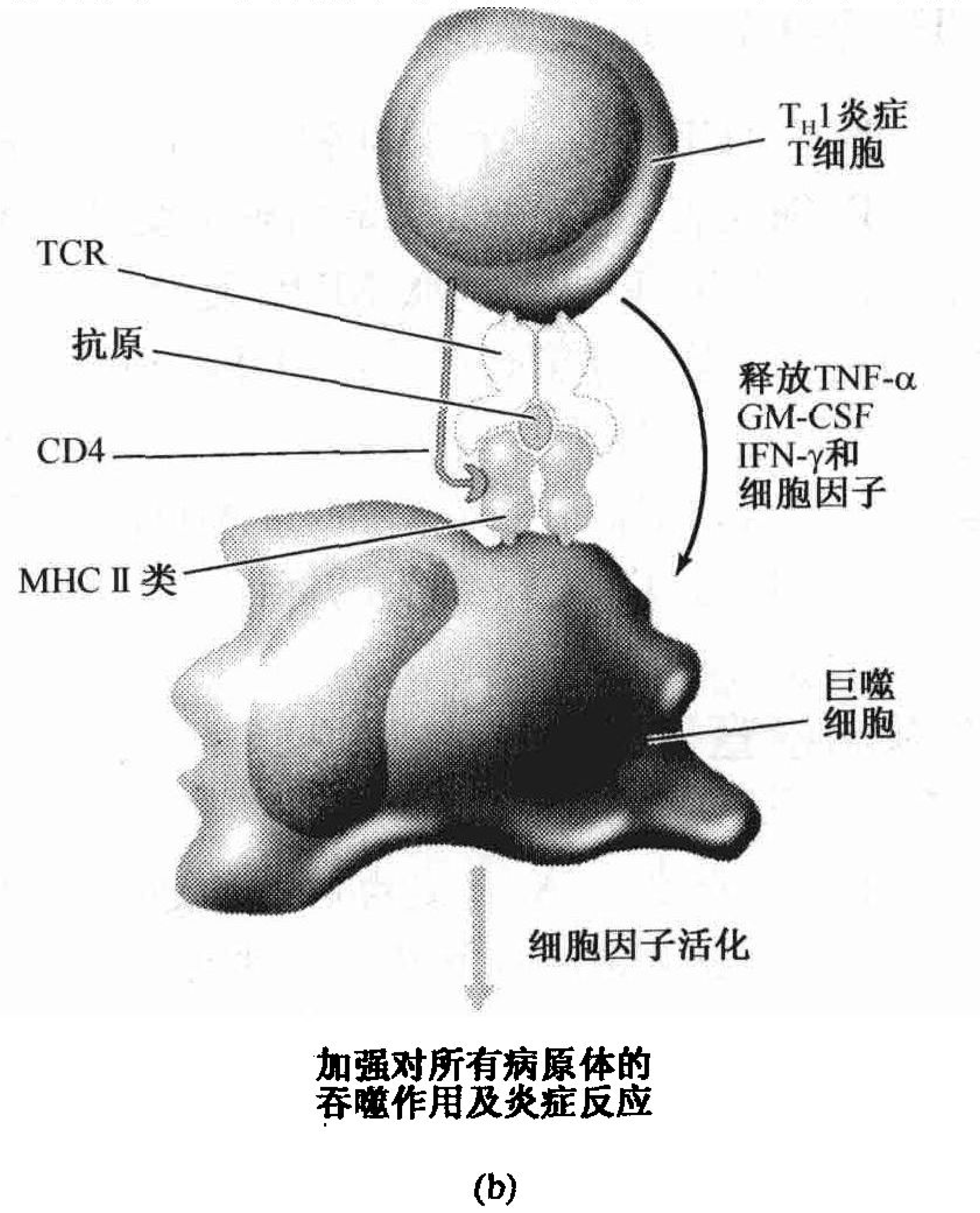


图 22.13 效应 T 细胞。(a) 细胞毒性 T 细胞或称 T_C细胞可以被细胞表面 MHC Ⅰ 类蛋白复合物中呈递的抗原活化。T_C细胞通过释放含有穿孔素和颗粒溶解酶的颗粒产生免疫应答，这些细胞毒素穿过靶细胞引起细胞凋亡。(b) T 炎症细胞或称 T_H细胞可以被巨噬细胞上 MHC Ⅱ 类蛋白中呈递的抗原活化。T_H1 细胞通过产生细胞因子引起免疫应答。细胞因子可以刺激巨噬细胞提高吞噬活性和引起炎症反应。

的表面。缺乏 T_C细胞识别抗原的细胞不参与这一过程。

天然杀伤细胞

天然杀伤细胞（natural killer cell，NK 细胞）是一类和细胞毒性 T 细胞不同的淋巴细胞。NK 细胞也扮演着杀伤胞内病原体感染细胞的角色。但 NK 细胞既不是 T 细胞，也不是 B 细胞。当受到抗原刺激后，它们的数量既不增加，也不表现出记忆性。然而，NK 细胞杀伤被感染细胞的能力并不比 T_C细胞逊色。例如，NK 细胞同样利用穿孔素和颗粒溶解酶杀伤靶细胞。

然而，NK 细胞与 T_C细胞的区别在于，NK 细胞杀伤靶细胞不需要特异性抗原的存在，在体外 NK 细胞就可以杀伤恶性的和被病毒感染的细胞。虽然以前 NK 细胞并未遇到或接触过这种外源抗原。

对 NK 细胞来说，其分子靶标似乎缺少适当的 MHC Ⅰ 类蛋白。NK 细胞识别正常细胞和它们的 MHC Ⅰ 类蛋白是通过一套特殊的 MHC Ⅰ 类蛋白受体。如果受体和 MHC Ⅰ 类蛋白结合，NK 细胞的杀伤机制被去活化；如果不结合，则 NK 细胞就杀伤那些不被识别的靶细胞。NK 细胞的主要靶标为肿瘤细胞和病毒感染的细胞，这些靶细胞表面 MHC Ⅰ 类蛋白的表达通常会减少或被改变。

概念检查

T_C细胞通过其抗原特异性 TCR 识别宿主被病毒感染的细胞和肿瘤细胞上的抗原。抗原特异性识别触发了这个杀伤过程，通过穿孔素和颗粒溶解酶实现杀伤作用。NK 细胞可以使用同样的效应因子杀伤病毒感染的细胞和肿瘤细胞，但 NK 细胞既不需要刺激，也不表现出记忆性；NK 细胞只在不存在 MHC 蛋白的情况下才发生应答。

◆ 区别并比较 T_C和 NK 细胞对靶标的识别机制。

◆ 描述 T_C和 NK 细胞共同的效应系统（细胞杀伤系统）。

22.8 辅助性 T 细胞：免疫应答的激活

本节中我们将介绍辅助性 T 细胞的功能及它们产生细胞因子对扩大免疫应答效应的关键作用。辅助性 T 细胞分两个类群：T_H1 和 T_H2 细胞。T_H1 细胞在巨噬细胞活化和炎症反应中发挥作用，而 T_H2 细胞则与 B 细胞相互作用，并辅助抗体的产生。

T_H1 细胞与巨噬细胞的活化

在抗体介导和细胞介导的两种免疫应答中，巨噬细胞作为 APC 起了关键作用。如图 22.12b 中所示，巨噬细胞结合、加工并呈递抗原给 T_H细胞。而且，作为吞噬细胞，巨噬细胞本身或经 T_H1 刺激也能摄取并杀伤那些外来细胞。T_H1 活化的巨噬细胞能杀伤那些在未活化巨噬细胞内繁殖的细菌或其他种类的细胞。例如，我们已提到的（见 22.2 节）有些细菌会在巨噬细胞内存活和繁殖，而大多数被巨噬细胞吞食的细菌会被杀死并消化。在巨噬细胞中繁殖的细菌包括结核分枝杆菌（*Mycobacterium*

tuberculosis）、麻风分枝杆菌（*Mycobacterium laprae*）（分别引起结核和麻风病），在单核细胞增生的包括李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）（引起李斯特病）。接种适当剂量的结核分枝杆菌的动物因可以产生 T 细胞介导免疫应答能够战胜感染并获得抵抗力。这些细胞包括 T 炎症细胞和 T_H1 亚群，它们通过分泌包括 IFN-γ（γ 干扰素）、GM-CSF（粒细胞-单核细胞集落刺激因子）和 TNF-γ（图 22.13b）的多种细胞因子活化巨噬细胞和其他非特异吞噬细胞。令人吃惊的是，这些免疫过的动物也可以吞噬和杀伤未接种的病原体（如李斯特菌），原因是被免疫后的动物的巨噬细胞已经被活化，所

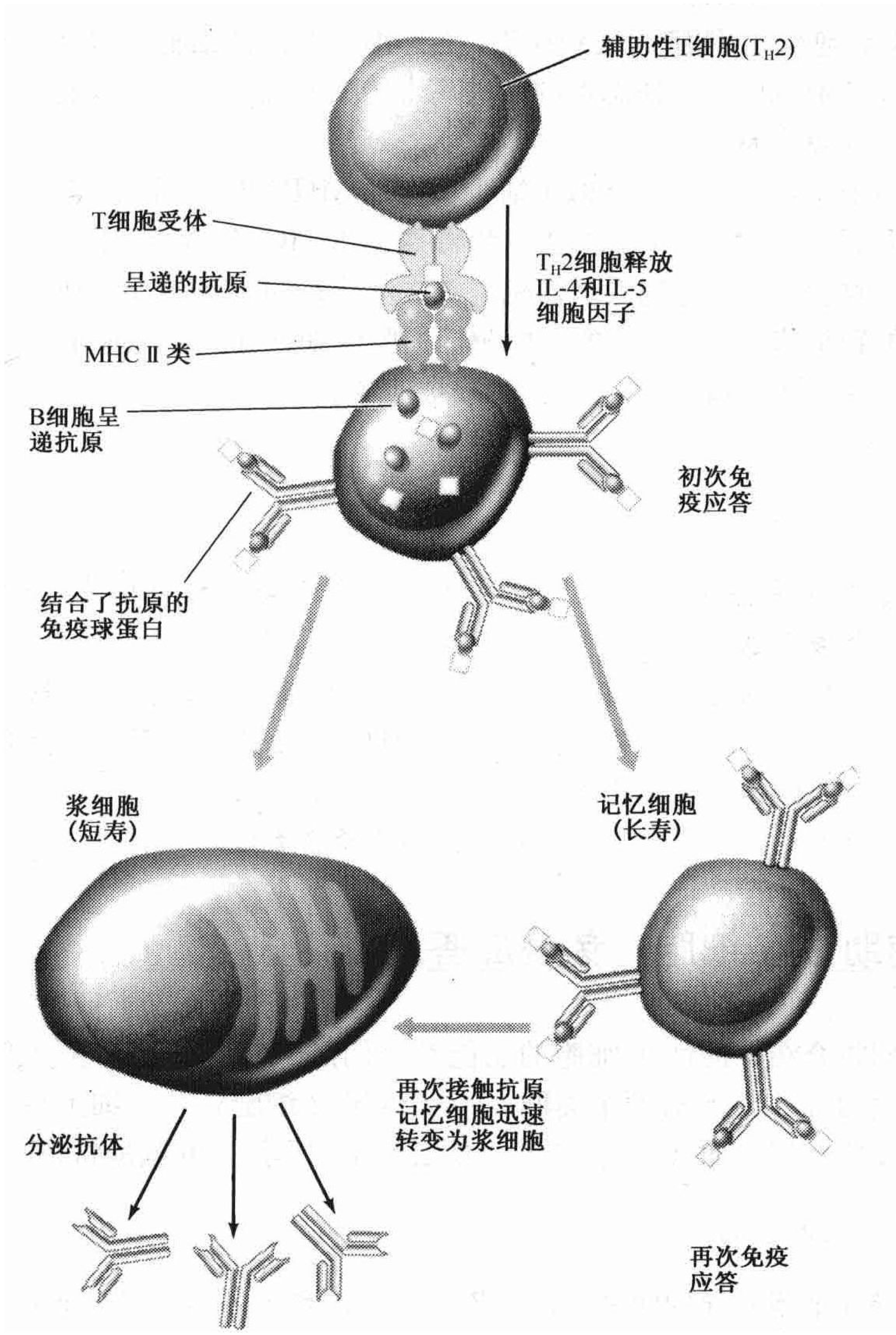


图 22.14　T 细胞-B 细胞相互作用和抗体的产生。 作为抗原呈递细胞（APC）的 B 细胞，首先以抗原特异性的免疫球蛋白识别抗原，随后加工抗原并通过 MHC Ⅱ 类蛋白分子将抗原呈递给 T_H2 细胞。T_H2 细胞再向这个 B 细胞发出信号，使其增殖，并形成浆细胞（产生抗体细胞）或记忆细胞，当再次接触相同的抗原时，记忆细胞迅速转变为浆细胞。

以它们可迅速地杀伤任何再次入侵者。另一些 T_H1 活化的巨噬细胞不仅可以杀伤外来的病原体，也能破坏外来的哺乳动物细胞，如肿瘤细胞上常带有正常细胞上没有的特异性抗原。由肿瘤特异性 T_H1 细胞产生的细胞因子所活化的巨噬细胞可以识别大多数的肿瘤细胞并将其破坏；由 T_H1 活化的巨噬细胞介导的移植排斥也是不同个体间组织器官移植时遇到的主要问题，这种情况下，T_H1 细胞因识别移植器官上的 MHC 蛋白，触发巨噬细胞活化，从而使移植物遭到损伤。

T_H2 细胞与 B 细胞活化

在 B 细胞活化和抗体产生过程中，T_H2 细胞具有关键作用。如 22.3 节中介绍的 B 细胞可以产生抗体，怎么又牵涉 T_H2 细胞呢？成熟的 B 细胞上包裹着一层抗体作为 B 细胞的抗原受体，但当抗原结合到 B 细胞上的抗原受体时，B 细胞并不立即产生可溶性抗体，代替产生抗体功能的是 B 细胞作为 APC 并与 T_H2 细胞相互作用。更特殊的是，被 B 细胞结合的抗原首先被吞进胞内并在 B 细胞中被分解，然后由分解抗原而来的肽结合在 MHC Ⅱ 类蛋白中呈递给 T_H2 细胞（图 22.12b 和图 22.14）。T_H2 细胞产生 IL-4 和 IL-5，这些细胞因子再刺激 B 细胞合成并分泌可溶性抗体，我们将在 22.10 节中重点介绍，由此可见，T_H2 细胞是 B 细胞活化产生抗体的辅助细胞。

概念检查

T_H1 和 T_H2 细胞在细胞介导和抗体介导的免疫应答中起关键作用。T_H1 细胞和 T_H2 细胞各自通过细胞因子的活性来刺激相应的效应细胞。

- ◆ 描述 T_H1 细胞在巨噬细胞活化中的作用。
- ◆ 描述 T_H2 细胞在 B 细胞活化中的作用。

Ⅲ 抗体和免疫

本节我们集中讨论 B 细胞和抗体在免疫中的作用。抗体是有效免疫应答中的重要成分，抗体对胞外病原体和危险可溶性蛋白质（如毒素）可提供特异性的免疫能力。当认识到抗体分子的本质后，我们将介绍 B 细胞对抗体的产生过程，探讨抗体在体外中和或破坏抗原的能力。

22.9 抗体（免疫球蛋白）

抗体或称免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）是指能与抗原决定簇结合的蛋白质分子，存在于血清或体液（如胃液和乳液）中，含有抗原特异性抗体的血清称为抗血清。免疫球蛋白（Ig）根据其物理化学和免疫学性质可以分为 5 大类，包括 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE（表 22.2）。在大多数个体中，血清免疫球蛋白的 80%以上为 IgG 类蛋白质，目前对它们已经有了广泛深入的研究。

表 22.2 人免疫球蛋白的性质

类群/H链[a]	分子质量/公式[b]	血清中含量/(mg/ml)	抗原结合位点	性质	分布
IgG γ	150 000 2(H+L)	13.5	2	主要的抗体，有4个亚类：IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4；IgG_1和IgG_3能激活补体	细胞外液、血液和淋巴、胎盘
IgM μ	970 000 5[2(H+L)]+J	1.5	10	免疫后首先出现的抗体；激活补体	血液和淋巴；单体是B细胞表面受体
	175 000 2(H+L)	0	2		
IgA α	150 000 2(H+L)	3.5	2	重要的循环抗体	分泌(唾液、初乳、细胞和血液)；单体在血液中，二聚体在分泌物中
	385 000(分泌型二聚体) [2(H+L)]+J +SC	0.05	4	主要的分泌抗体	
IgD δ	180 000 2(H+L)	0.03	2	微量循环抗体	血液和淋巴；B细胞表面
IgE ξ	190 000 2(H+L)	0.000 05	2	出现在变态反应中；C_H4有肥大细胞结合片段	血液和淋巴；结合肥大细胞

a. 所有 Ig 轻链可以是 λ 链或 κ 链 但不可能是两型共存。

b. 每一个功能分子根据重链和轻链的数目和排列方式而定。J 是存在与血清 IgM 和分泌型 IgA 中的连接蛋白；SC 是存在于分泌型 IgA 中的分泌成分，见图 22.15、图 22.17、图 22.18 和图 22.19 中每个 Ig 的图解。

IgG 结构

IgG 是最常见的循环抗体，其分子质量约为 150 000，由 4 条肽组成（图 22.15）。

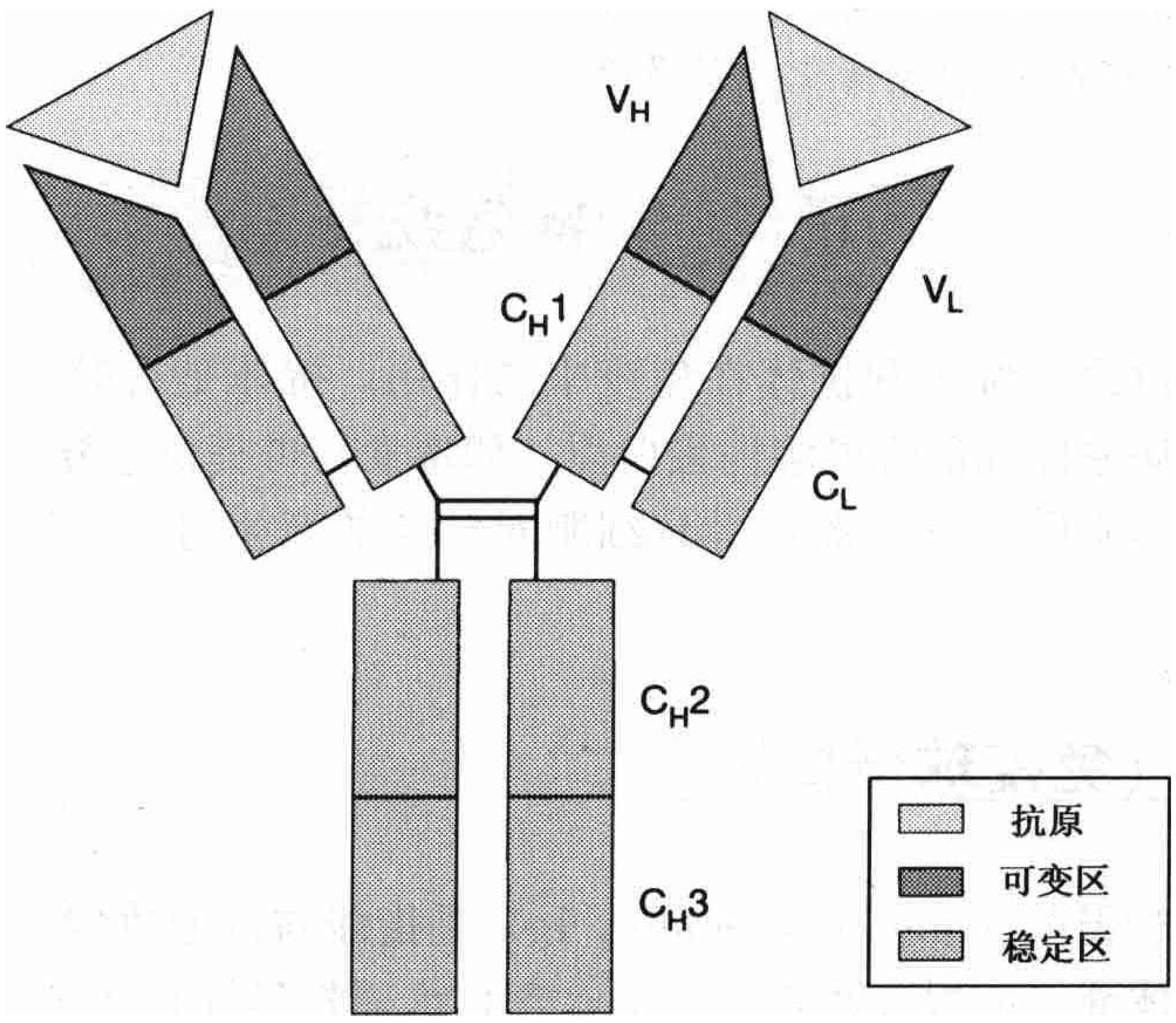


图 22.15 免疫球蛋白 G 的结构。 IgG 由两条重链（分子质量 50 000）和两条轻链（分子质量 25 000）组成，总分子质量为 150 000。一条重链和一条轻链相互作用形成一个抗原结合点。重链和轻链的可变区（V_H 和 V_L）应用来结合抗原，并在不同的 Ig 中表现出不同的序列，在所有 IgG 中，其恒定区（C_H1、C_H2 和 C_H3）是相同的，在 IgG 分子中链间是由二硫键共价连接的。

链间的二硫桥（S—S 连接）将各肽链连在一起。在每个 Ig 蛋白分子中，两条完全相同的分子质量为 25 000Da 的轻链与 2 条完全相同的分子质量为 50 000Da 的重链分别配对。每条轻链约有 220 个氨基酸，每条重链约有 440 个氨基酸。有抗原结合功能的 IgG 抗体有两个抗原结合部位，每个抗原结合单位分别由一条重链和一条轻链组成，因此抗体是二价的，都结合特定的表位。

轻链

IgG 的每条轻链由两个大小相同的结构域（domain）组成（图 22.15）。N 端为可变区（variable domain），意思是在本区内的氨基酸序列在不同的抗体中是不同的。可变区中又含有抗原结合区。与可变区不同，C 端为恒定区（constant domain），本区内的氨基酸序列在同型的轻链中是相同的。

重链

IgG 的每条重链由一个 N 端的可变区和三个恒定的结构域组成，每个结构域由 110 个氨基酸组成，像轻链一样，每条重链的三个恒定结构域在同类抗体中是相同的，而可变区在每一抗体中是不同的。

抗原结合位点

IgG 及其他所有 Ig 的抗原结合位点都是由重链和轻链的可变区之间相互作用共同形成的（图 22.16），两条链的可变区相互作用形成一个与抗原以非共价键但可紧密结

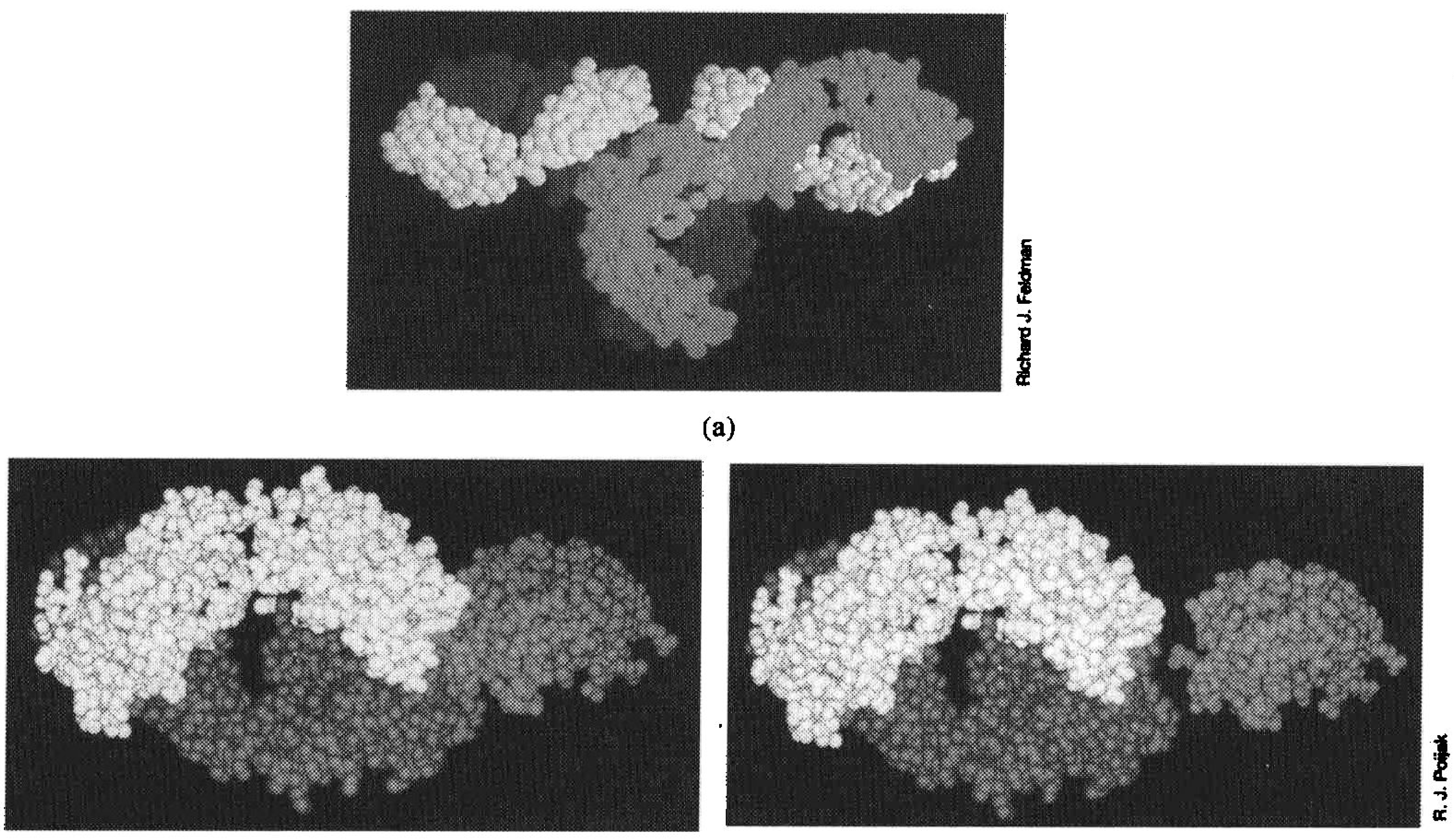


图 22.16 免疫球蛋白结构和抗原结合部位。（a）IgG 分子的三维空间构型。红色和深蓝色表示重链，绿色和浅蓝色表示轻链。（b）Ig 和抗原结合部位的结构，抗原（溶菌酶）为绿色，Ig 重链可变区用蓝色表示，轻链以黄色表示，红色表示溶菌酶谷氨酰胺残基。谷氨酰胺残基装进 Ig 分子的袋子中，但全部的抗原-抗体识别也包括了 Ig 和抗原上其他几个氨基酸之间的接触。

合的分子位点。结合强度也称为抗原的亲和性（antigen-binding affinity）。如果抗原和抗体的相互作用非常强烈并且能被抗体紧紧固定，那么该抗体就是高亲和性抗体。

个体的免疫系统都具有识别和结合无数种抗原的能力，而且对每一种抗原的识别是由独特的抗原结合位点决定的。对所有可能提供的抗原，每一个个体都能够产生数十亿种不同抗原结合位点的抗体。那么抗原结合位点的多样性又是如何产生的呢？如 22.10 节和下一章中讨论所讲述的那样，这种多样性是由于编码重链和轻链可变区的 300 个或更多基因的随机结合和突变，不断创造出新的抗体。每一个 Ig 结构基因编码一个具有独特的抗原结合位点的 Ig，并表达在 B 细胞表面。当抗原和这些独特的 B 细胞上的 Ig 相互作用时，即刺激 B 细胞产生该 Ig 的复制品，并分泌到胞外成为可溶性抗体（见 23.5 节）。

免疫球蛋白的其他类型

其他类型的免疫球蛋白与 IgG 不同，Ig 分子根据重链恒定区氨基酸序列确定其类别，分别为 γ、α、μ、δ 和 ξ 的 5 种氨基酸序列之一。恒定区序列构成 IgG、IgA 和 IgD 重链的羧基端 3～4 个功能区，及 IgM 和 IgE 的 4～5 个功能区（图 22.17）。例如，每一个 IgM 类抗体其重链恒定区含有的氨基酸构成 μ 链序列。

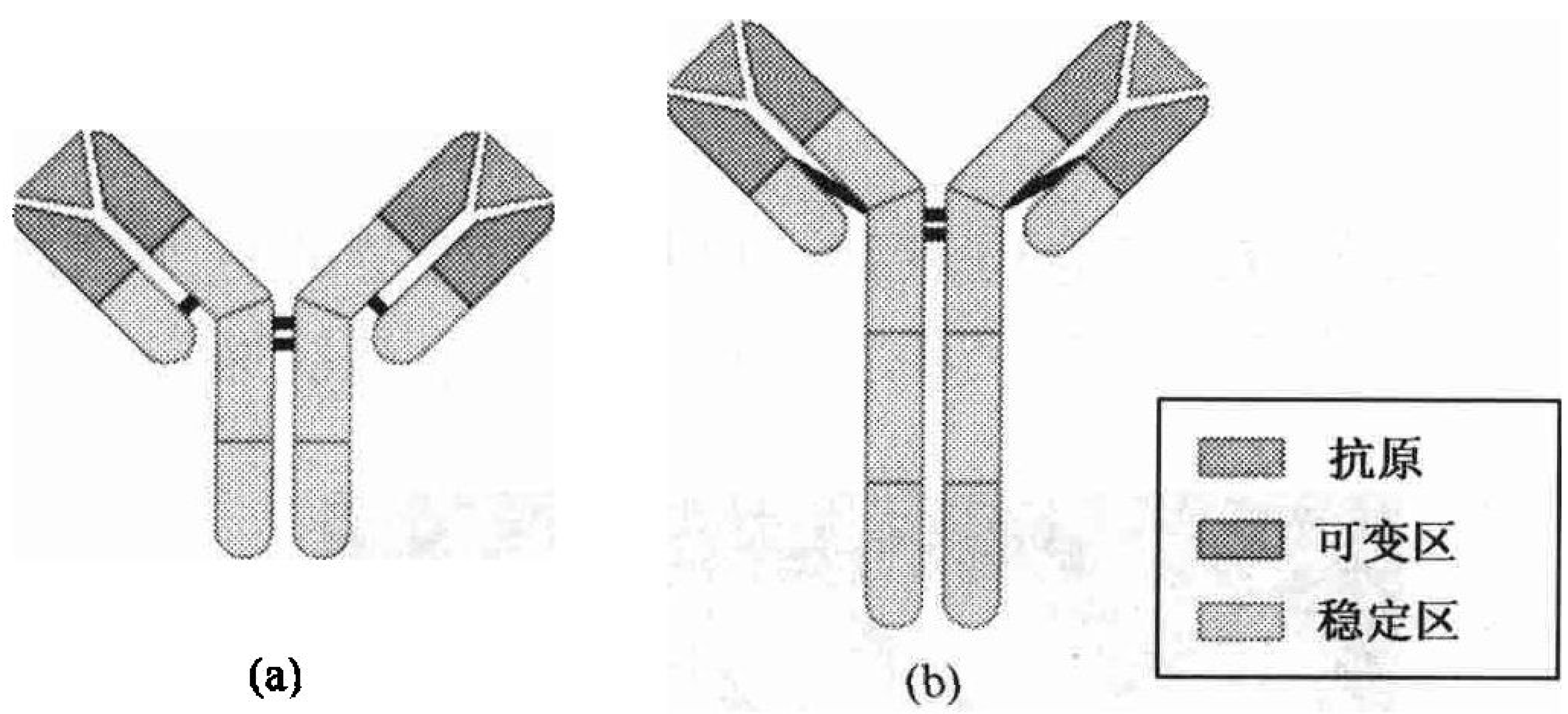


图 22.17 免疫球蛋白的类型。所有 Ig 都具有 V_H 和 V_L 功能区（红色），为结合抗原（棕色）部位。(a) IgG、IgA 和 IgD 恒定区有 3 个功能区（蓝色）。(b) IgM 和 IgE 各有 4 个恒定的功能区。

在典型的免疫应答中，两类不同的 Ig 经常为 IgM 和 IgG，可以结合相同的表位。这种情况下，IgM 和 IgG 的重链和轻链的可变区（结合抗原）可以是独特的，但决定其 Ig 类型的重链恒定区是不同的，因为 IgM 表达 μ 重链，IgG 表达 γ 重链。

IgM 的结构如图 22.18 所示。IgM 通常由至少 1 个 J 链连接 5 个 Ig 分子而成的多聚体。IgM 的每条重链含有 4 个恒定功能区（C_H4）。IgM 是细菌感染后免疫应答过程中首先出现的免疫球蛋白的类型，但 IgM 通常是低亲和性的，然而由于五聚体 IgM 分子的高结合价，共有 10 个抗原结合部位可以和抗原相互作用，使 IgM 分子的抗原结合强度大大提高（表 22.2 和图 22.18）。亲和力（avidity）是指多价抗原结合分子的抗原结合强度。因此，IgM 对抗原具有低亲和性和高亲和力。大约 10% 血清抗体为 IgM，IgM 单体存在于 B 细胞的表面，作为抗原受体结合抗原。

二聚体形式的 IgA 存在于体液，如唾液、泪液、初乳和胃肠道、呼吸道、生殖道等黏膜分泌液中。所有黏膜表面都与产生 IgA 的黏膜相关淋巴器官（mucosal-associated lymphoid tissue，MALT）相关（图 22.2）。人体产生 IgA 的黏膜总面积约 $400m^2$。

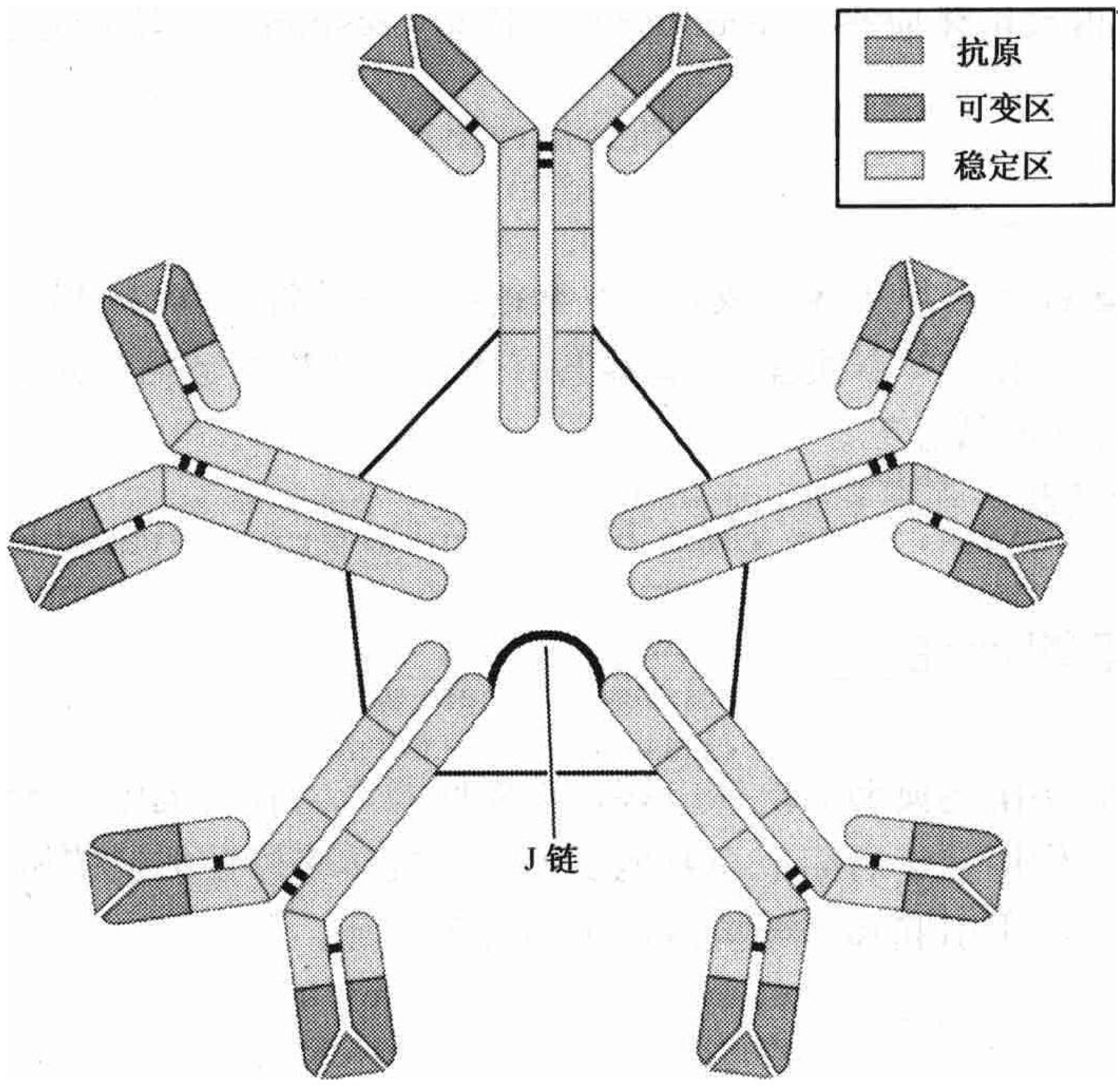


图 22.18　免疫球蛋白 M。 血清中的 IgM 是由 5 个 IgM 分子组成的五聚体，它们由二硫键和 1 个 J 链蛋白质连接起来。由于是五聚体，所以 IgM 可以同时结合 10 个抗原，如图所示。

每天大约产生的 IgA 有 10g，相比而言，每人每天产生的血清 IgG 只有 5g。因此，机体产生分泌型 IgA 的总量比血清 IgG 的量高。分泌型 IgA 的 2 个 IgA 分子通过肽链连接组成，并由 1 个蛋白质分泌性组分使得 IgA 穿过细胞膜（图 22.19），IgA 单体存在于血清中（表 22.2）。

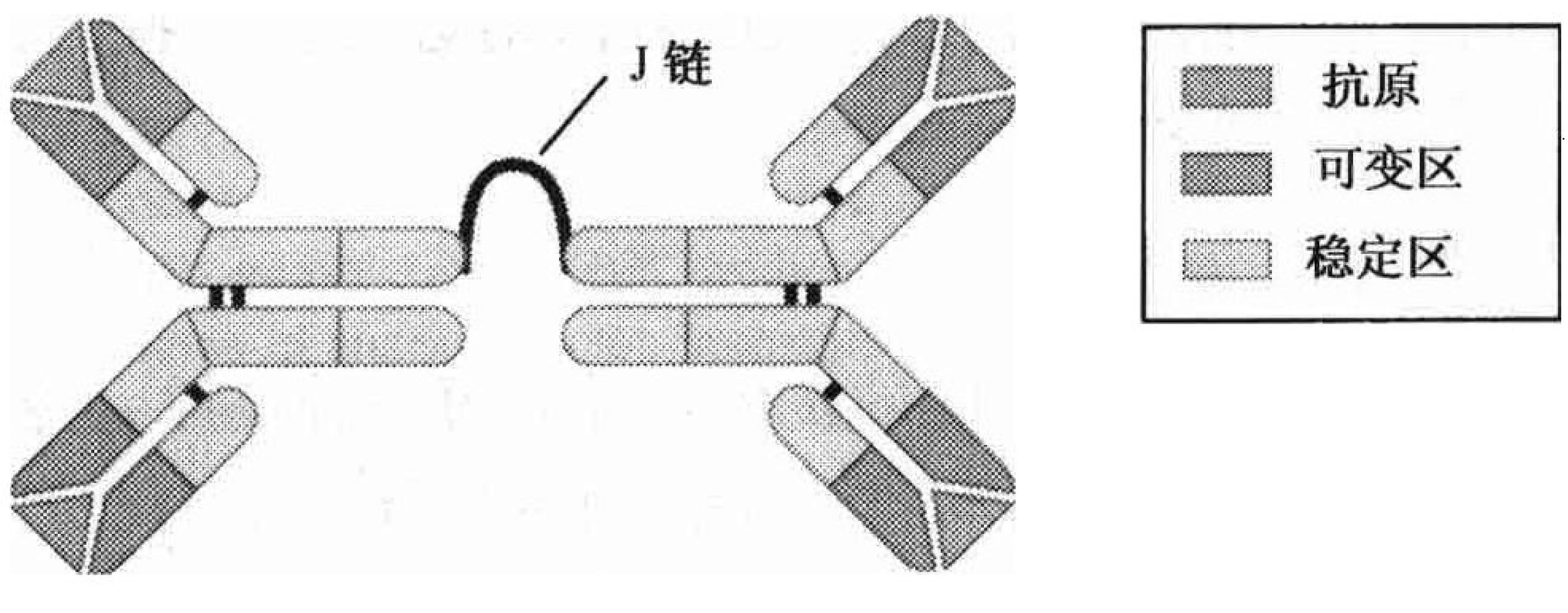


图 22.19　免疫球蛋白 A。 分泌型 IgA 常存在于分泌液中，是由 J 链连接成的二聚体，分泌性蛋白质能帮助 IgA 穿过细胞膜，此图未表示。

IgE 以极为微小的含量存在于血清中（约每 50 000 个血清 Ig 分子中才有一个）。不论其浓度高低，但它是很重要的，这是因为速发型超敏反应是由其介导的（见 22.15 节）。IgE 分子质量比其他 Ig 的分子质量高（表 22.2）。因为和 IgM 一样，IgE 也有 4 个恒定的功能区（图 22.17）。多出的第四个恒定区其功能为连接 IgE 到肥大细胞表面（图 22.25），这是发生变态反应的重要前提条件。

IgD 以低浓度存在于血清中，其功能至今尚不清楚，但 IgD 和 IgM 一样，存在于 B 细胞的表面，特别是前者存在于记忆 B 细胞（memory B cell）上。由此可见，IgD 作为

B细胞表面Ig对再次抗体应答（secondary antibody response）有可能是很重要的。

概念检查

Ig（抗体）蛋白由4条肽链组成，2条重链，2条轻链。重链和轻链的可变区相互作用形成抗原结合部位。每种类型的Ig都具有不同的结构和功能特点。

◆ 识别Ig的抗原结合区。

◆ 以功能和结构特征区别Ig的类型。

22.10 抗体的产生

本节中，我们将阐述典型的抗体应答，首先回顾产生有效抗原特异性免疫所必需的细胞间复杂的相互作用，然后简单扼要地了解一下抗体多样性的遗传机制，最后我们将介绍在抗原应答过程中引起和诱导抗体产生的显著特征。

T细胞-B细胞之间的相互作用

在对抗原的应答中，抗体的产生包括T细胞和B细胞的相互作用，它们通过各自抗原特异性的细胞表面分子，即T细胞上的TCR和B细胞上的Ig（图22.14）相互作用。抗体产生的每一步都是高度特异的，从接触抗原开始，B细胞通过抗原特异性的表面Ig与抗原结合，然后抗原-Ig复合物被内在化，并将抗原装配在MHC Ⅱ类蛋白中，并呈递抗原。由此可见，B细胞的第一个功能是作为抗原呈递细胞，用其表面Ig捕获抗原，然后再将MHC-抗原复合物运输到细胞表面，以利于与表面带有抗原特异TCR的T_H2细胞相互作用（图22.12b）。B细胞MHC-抗原复合物再激活抗原特异性T_H2细胞，使其产生细胞因子。细胞因子的释放能刺激附近的抗原特异性B细胞，使其活化，产生并分泌抗原特异性抗体。

抗体和TCR多样性的遗传机制

每一个个体都能产生千百万种不同的抗体，针对每一种抗原，免疫系统如何选择正确的抗体呢？早期的理论认为，机体可能有编码每种抗体的基因，但现在我们已经了解到，只有少数的基因用于编码这一极大多样性的抗体。抗体的产生开始于编码此Ig所必需的基因的逐级重排。当淋巴细胞在骨髓中发育时，重链和轻链基因的重排就在B细胞中发生了。在成熟的淋巴细胞中，基因被再次组装，基因片段以各种各样的组合相互搭配，即基因剪接和重排，这个过程包括了已知的体细胞重组（somatic recombination）。图22.20显示了人κ轻链重排和表达的模式。重链基因重排和轻链相似但更复杂。在每一个成熟的B细胞中，最终结果是有1个单功能重链基因和1个单功能轻链基因。每种重排的基因都被转录并表达在B细胞表面作为抗原受体。当受到抗原刺激后，如上所述，B细胞就可产生可溶性Ig。另外，抗原诱导的Ig基因的高频突变，进一步增加了抗体的多样性表达。抗原刺激引起的基因重排，以及复制时体细胞的突变，都会使得Ig具有无限的多样性（见23.6节）。

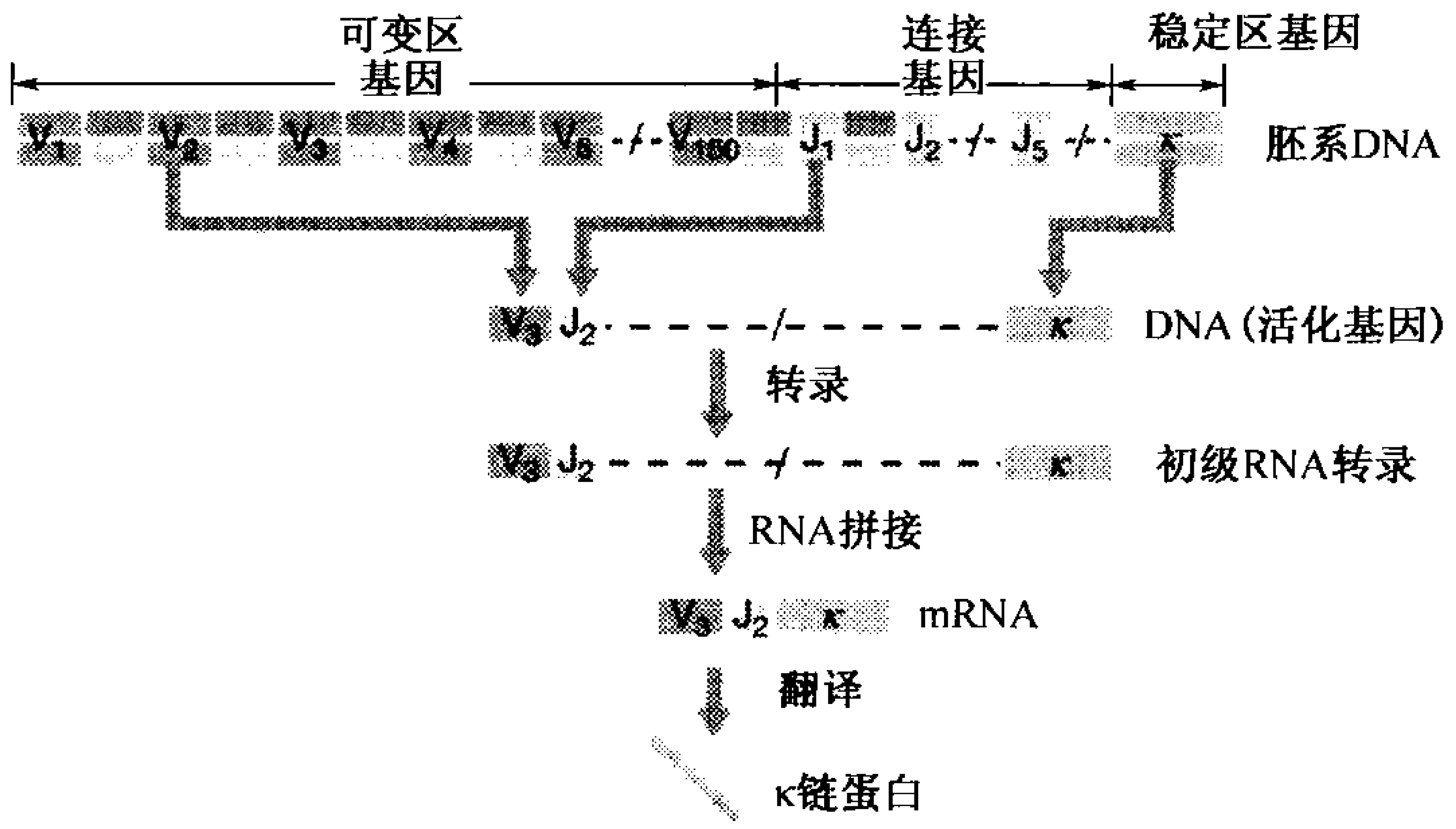


图 22.20 人类 B 细胞中免疫球蛋白 κ 链的基因重排。 κ 轻链复合体基因片段串联排列在 2 号染色体上，并在成熟的 B 细胞中完成 DNA 重排。150 种不同的 V 区中的任一种都可与 5 种 J 序列中的任一种结合。因此，有 750 种不同的重组体，编码 750 种不同的 κ 链，但是对于每个细胞只有一种重组体。在每个 B 细胞中，重链也发生类似的重排。重链基因复合体有更多的基因片段，能产生更多的重组体。但是同样对于每个 B 细胞也只有一种重组体。然后再由 2 个轻链蛋白和 2 个重链蛋白结合并形成成熟的 Ig 蛋白质分子。

T 细胞在发育期间也发生类似的重排，并产生 T 细胞受体的多样性，然而，T 细胞没有高频突变机制来扩大其多样性（见 23.8 节）。

抗体产生和免疫记忆

首先 B 细胞能表达细胞表面 Ig 分子，与抗原接触的 B 细胞再产生抗体。抗原特异性抗体的产生和分泌，按以下顺序进行：

(1) 抗原通过淋巴和血液循环系统进入附近的外周淋巴器官，如淋巴结、脾脏或黏膜相关淋巴组织（MALT）（见 22.1 节和 22.2 节）。抗原进入途径影响抗体产生的性质。静脉注射的抗原，可以通过血流进入脾脏，主要形成 IgM、IgG 和血清 IgA 类抗体，而由皮下、皮内、体表或腹腔进入体内的抗原则由淋巴系统将其带入就近的淋巴结，也主要刺激产生 IgM、IgG 和血清 IgA 类抗体。黏膜表面的抗原进入就近的 MALT。例如，通过口腔进入的抗原，经口腔进入肠道 MALT，首先在肠道刺激特异性抗体产生，初次应答产生 IgM，再次应答产生抗原特异性分泌性 IgA 抗体。

(2) 随着与抗原的接触，抗原刺激的 B 细胞开始增殖、分化，形成分泌抗体的浆细胞（plasma cell）和记忆细胞（memory cell）（图 22.14）。相对来说，浆细胞是短寿的（短于一周），在初次抗体应答（primary antibody response）时会产生和分泌大量的 IgM 类抗体（图 22.21）。在初次抗体应答中，血液中出现特异性抗体之前，有一个潜伏期，随后抗体滴度（antibody titer）（抗体量）会逐渐增加，然后再慢慢下降。

(3) 初次接触抗原后产生的记忆 B 细胞（memory B cell）可以存活 5 年，如果在这期间再次接触到同一种抗原，记忆 B 细胞则无需 T 细胞的活化即可快速转化为浆细胞开始产生 IgG 抗体。抗体滴度可以迅速提高到初次应答的 10～100 倍，这种抗体滴度的提高就是再次抗体应答（secondary antibody response）（图 22.21）。再次应答是免疫记

忆（immunologic memory）的结果，与初次应答相比，发生的更迅速，并产生更多的抗体。由产生 IgM 转换为 IgG 也是再次应答的特点，这一现象称为类型转换（classic switching）。(图 22.21)。

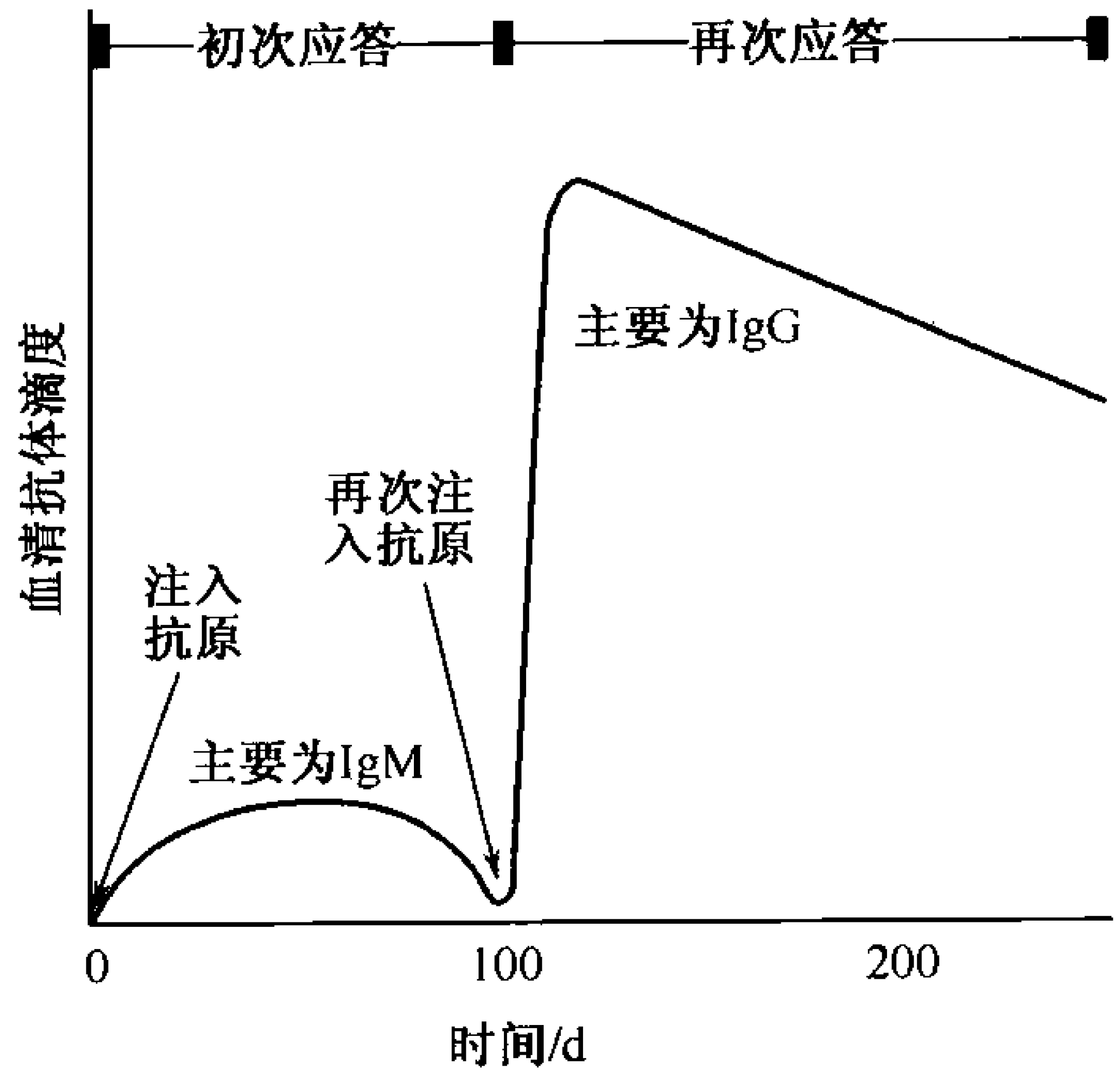


图 22.21 初次和再次应答的血清抗体。 0 天和第 100 天注入的抗原必须是相同的才可诱导再次应答。再次应答，也称为加强应答，可以比初次应答强 10 倍以上，初次应答一般产生 IgM，而再次应答则转换为 IgG。

(4) 当抗体滴度慢慢减少后，再次接触相同的抗原可以引起再一次的应答。免疫过程中熟知的加强接种就是以再次应答为基础的（如每年给家养动物注射狂犬病疫苗）。加强接种可以保持高水平的特异性循环抗体，并提供更长期的抗某种传染病的能力（见 22.12 节）。

概念检查

抗体的产生开始于抗原和抗原特异性 B 细胞的接触。B 细胞加工处理抗原，并将抗原呈递给抗原特异性 T_H2 细胞，然后活化的 T_H2 细胞传递信号，使抗原特异性 B 细胞产生抗体。活化的 B 细胞作为记忆细胞可存活 5 年，当再次接触同一抗原时，记忆细胞会迅速产生大量的抗体（高滴度）。

- B 细胞是如何作为 APC 的？
- T_H2 细胞是如何活化抗原特异性 B 细胞的？
- 阐述合理的加强免疫接种的程序。

22.11 补体、抗体及病原体的破坏

补体（complement）是一组按一定顺序相互作用的血清相关蛋白质，作为效应因子在先天和获得性免疫中发挥重要作用。通常，补体蛋白与抗原抗体复合物相互作用而被活化，但无特异性抗体存在时也可以被固有机制活化。补体蛋白能够按一定顺序反应引起细菌细胞的溶解（lysis），并在表达抗原的细胞上做标记，以提高吞噬细胞的识别

能力，加速抗原的破坏。

经典的补体活化途径和细胞损伤

补体由多种蛋白质组成，许多具有酶活性。菌体上的抗原-抗体复合物能以有序方式将补体活化，导致菌体细胞膜破坏，内含物流失，引起菌体细胞的溶解。在所有个体中补体蛋白的血清含量是相似的。抗体的重要功能是识别侵入细胞，活化补体系统。因此，许多针对某一单一抗原的特异性抗体，都能够募集体内各处的补体蛋白，免疫系统不需要独特的酶去攻击每一个入侵的介质。

通常补体蛋白可以用 C1、C2、C3 等表示。补体活化的经典途径也只有当 IgG 和 IgM 类抗体存在时才发生。当 IgG 或 IgM 与细胞表面抗原结合时，抗体才能固定补体蛋白（图 22.22），补体蛋白以级联方式顺序反应，一个补体成分活化会导致下一个成

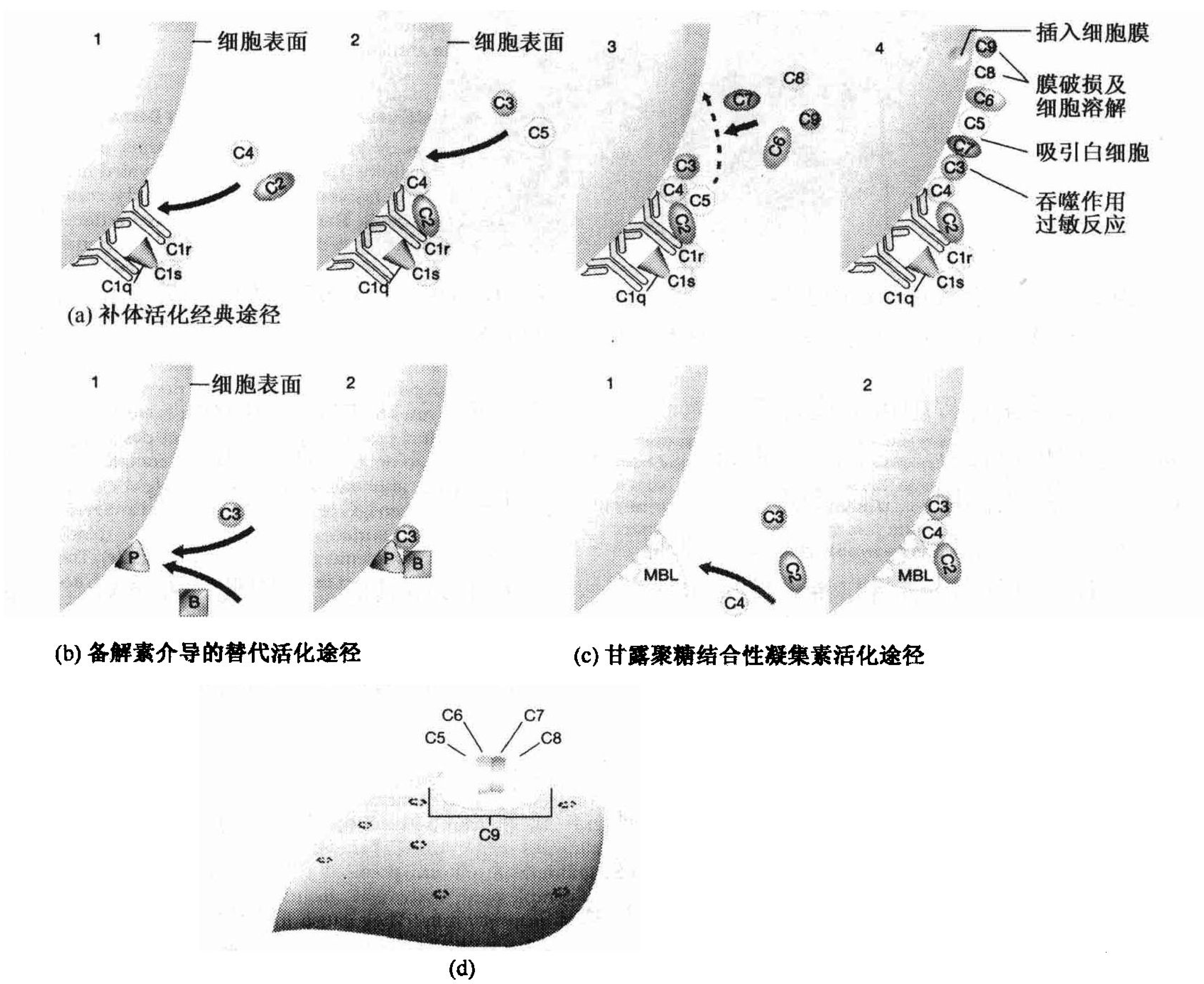


图 22.22　补体活化。(a) 经典途径。当补体和溶解细胞相互作用时，补体的活化、顺序及定位：图示 1：C1 蛋白复合物与抗体的结合；图示 2：C42 复合物与 C3 相互作用；图示 3：C423 活化 C5，C5 结合在细胞膜邻近位点上；图示 4：C6、C7、C8 和 C9 按顺序与 C5 结合并在胞膜上产生孔洞，C5-C9 为膜攻击复合物（MAC）。(b) 替代途径。备解素与膜结合，随后形成 C3B 复合物，复合物活化 C5，下边步骤同上述的图示 3，并开始形成 MAC（上图示 4）。(c) 甘露聚糖结合性凝集素 MBC 途径。MBC 与细菌细胞膜上的甘露糖结合形成 C423 复合物并活化 C5（上图示 3），并开始形成 MAC（上图示 4）。(d) 补体 C5 通过 C9 在膜上形成孔洞的图示。

分的活化，以此类推。① 抗体和抗原的结合是启动活化的关键步骤（起始）；② 补体 C1 结合到抗原-抗体复合物上，导致 C4-C2 活化，并结合到附近的细胞膜上，并与 C3 结合；③ 膜结合的 C3 催化 C5-C6-C7 复合物的形成，并结合在膜的另一位点上，然后 C8 与 C9 再与上述复合物结合在一起，最终导致细胞膜损伤和细胞溶解（图 22.23）。C5-C9 复合物称为膜攻击复合物（membrane attack complex，MAC），由它们在膜结合位点的相互作用而使得膜上形成孔洞。

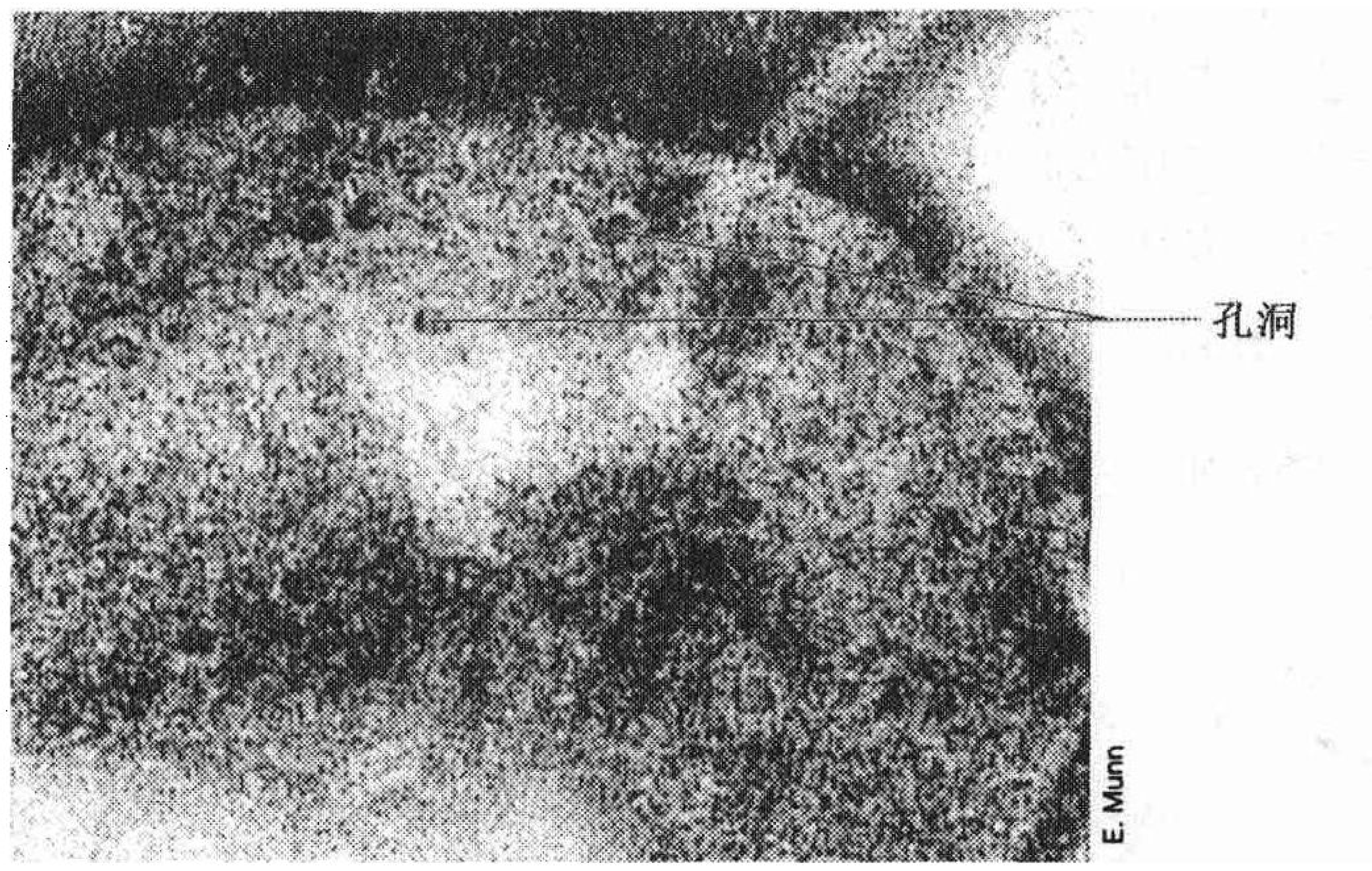


图 22.23 补体在细菌细胞上的活化。图为沙门氏菌的电镜照片。未被染色的部分表示由于细菌细胞膜上的抗原、特异性抗体和补体相互作用引起的胞膜孔洞。

补体活化过程中可形成许多产物，包括称为超敏毒素（anaphylatoxin）的化学吸引剂。它们可以在补体活化的邻近部位引起炎症反应（见 22.15 节）。由 C3 反应产生的 C3b 具有趋化作用，可以吸引并活化吞噬细胞，其结果使得吞噬的作用增强，由 C5 反应产生的 C5a 能吸引 T 细胞和促进细胞因子的释放等。

当革兰氏阴性细菌与特异性抗体结合时，补体可以将其破坏，因此，补体对许多革兰氏阴性细菌来说是杀菌剂和溶菌剂。然而，补体并不能杀死革兰氏阳性细菌，甚至其特异性抗体存在时也不能杀死，但是革兰氏阳性细菌可以通过调理作用被破坏。

调理作用

当抗体与细胞表面抗原结合时，细胞很可能被吞噬。当补体与细胞表面抗原-抗体复合物结合时，细胞则更容易被吞噬，这是因为大多数吞噬细胞，包括巨噬细胞和 B 细胞，不仅具有抗体的受体（FcR），而且还具有补体 C3 的受体（C3R），这些受体分别与抗体的恒定区和补体 C3 蛋白结合，因抗体结合会使正常吞噬功能提高 10 倍以上，而因与 C3 的结合会使其增强 20 倍。这种由抗体和补体的结合而提高吞噬功能的现象称为调理作用（opsonization）。

革兰氏阴性细菌可通过这种方式被调理，导致吞噬功能的提高和病原体的破坏。而对革兰氏阳性菌来说，抗体必须首先结合在其表面的抗原表位上以活化补体的经典途径，并促进调理作用。

非抗体依赖的补体活化

替代途径（alternate pathway）是补体活化的非特异性方式，很多经典途径中的补体成分也共同参与，并产生调理作用和具有生物活性的 C5-C9 膜攻击单位。替代途径活化补体是通过与经典途径无关的几种血清蛋白的作用（图 22.22b），在抗体的结合部位，替代途径运用其唯一的替代蛋白攻击革兰氏阳性和阴性细菌表面的靶分子。替代途径活化的第一步是将血清蛋白-备解素（P）结合到菌体细胞表面，膜结合的备解素与 CB 结合，固定在细胞上的 C3BP 复合物的作用相当于经典途径中 C423 复合物，可催化 C5-9 膜攻击单位的形成，并引起细胞的破坏。由替代途径经固定在细胞表面的 C3 通过吞噬细胞上 C3 受体的调理作用可以提高吞噬功能。

补体系统活化的另一个方法是通过甘露聚糖结合性凝集素（mannan-binding lectin，MBL）途径，这一途径依赖于血清 MBL 蛋白的活化，MBL 蛋白能结合到特定的甘露聚糖上——只存在细菌细胞表面的多糖（图 22.22c），MBL-多糖复合物相当于经典途径中的 C1 复合物，可将 C4、C2 和 C3 成分固定在细胞表面，也同样催化 C5-9 MAC 的形成，并导致细胞溶解或引起对细菌细胞的调理作用。

替代途径和 MBL 途径可以非特异性地消灭入侵的细菌，并导致 MAC 的活化，提高调理作用。像 Toll 样受体一样，备解素和 MBL 以病原相关分子模式为攻击目标，这两种蛋白质也是模式识别分子（pattern recognition molecule，PRM）（见 22.2 节和 23.1 节）。此外，这两条途径也是先天免疫系统的重要组成部分，不论备解素途径还是 MBL 途径，都无需抗体的存在或预先与抗原接触。像在补体经典途径中一样，替代途径和 MBL 途径都能活化 C3，进而形成 C5-9 MAC 及依赖 C3-膜复合物提高调理作用。

概念检查

补体系统可以促进细菌细胞的裂解和调理作用。补体和抗体相互作用或与非特异性活化因子相互作用而被活化，补体是机体先天或获得性防御机制的重要组成部分。

- 掌握能固定补体的免疫球蛋白的种类
- 了解启动调理作用和引起细胞溶解的补体成分
- 掌握补体非特异活化的两种机制。

Ⅳ 免疫和感染性疾病的预防

我们已经描述了天然免疫的基本特征，现在转换到用人工的方法获得免疫的话题。我们要讨论两方面内容，即免疫原制备的标准和实验技术。这些方法的应用使我们对各种病原体及其产物获得了安全的免疫的能力。因此人工免疫接种是我们对抗多种感染性疾病的重要武器。

22.12 天然免疫

先天免疫和获得性免疫对机体的作用都是保护宿主免受感染，两种免疫力是生存的基础。例如，患有先天免疫遗传缺陷的个体，其嗜中性粒细胞或巨噬细胞发育成为无功能的吞噬细胞，这些细胞不能吞入和消灭病原体，其结果是这些患者在没有医疗干预（如与所有暴露环境隔离）的情况下是无法生存的；在正常环境中他们会因各种细菌、病毒和真菌引起的反复性感染而夭折。由此可见，获得性免疫对生命是不可或缺的。

获得性免疫和感染性疾病的预防

动物通常具有天然自动免疫（natural active immunity）以对抗各种疾病，这种天然自动免疫是通过自然感染引起获得性免疫应答而获得的。天然自动免疫是感染或接触抗原而引起的直接后果，这种免疫力通常是由抗体及 T 细胞提供的保护性免疫。

患有某种遗传性失调症的患者有力地证明了自动免疫在疾病预防方面的重要性。例如，无 γ 球蛋白血症（agammaglobulinemia），就是因为患者的 B 细胞缺陷而引起的不能产生抗体的一种疾病，这种患者常遭受反复感染，生命受到细菌感染的威胁，但其对病毒却具有正常的免疫应答。由此可见，抗体介导免疫是对抗胞外病原体，特别是细菌感染的基础。

患有 DiGeorge 综合征（DiGeorge's syndrome）的个体是因胸腺成熟受阻而引起的缺陷症，由此无法产生成熟的 T 细胞，患者常受到被各种病毒及其他胞内病原体反复严重感染的威胁。由此可见，DiGeorge 综合征是 T 细胞缺陷的问题，说明了 T 细胞免疫在疾病预防中的重要作用，即 T 细胞免疫主要预防胞内病原体的感染。

获得性免疫应答综合缺乏在获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome，AIDS）患者中可以被再次观察到。在感染 HIV 病毒（human immunodeficiency virus，HIV）的 AIDS 患者中，如果不加控制，则可能因为 CD4（T_H）细胞的耗尽，而导致有效的抗体介导和细胞（T 细胞）介导的免疫的缺失。这种患者会经常遭受被病毒、细菌和真菌等病原体反复性严重感染的威胁。AIDS 病的死亡者都是以一种或多种感染为特征的。

概念检查

先天性和获得性免疫应答对生存来说是必须的。先天免疫的缺损引起的死亡是由于反复的无法控制的感染造成的；获得性免疫的缺损也会导致不可控制的感染性疾病。

◆ 描述先天免疫的缺失对机体所造成的影响。

◆ 描述 T 或 B 细胞的免疫缺失所造成的影响。

22.13 人工免疫

有目的的人工诱导对感染性疾病的特异免疫力是治疗和预防感染性疾病的主要措施。人工诱导免疫可以有很多方法。① 使机体接触抗原，以诱导抗体产生，这种免疫叫人工主动免疫（artificial active immunity），可使机体产生抗体，这种免疫接种过程就是大家熟知的接种疫苗（vaccination）。②另一个方法是给机体注射抗血清或纯化的免疫球蛋白（γ球蛋白），这种抗血清或抗体来自于接触过某抗原并形成抗体的另一个体。这种方法称为人工被动免疫（artificial passive immunity），因为机体得到的是抗体而不是使机体主动产生抗体的过程。③某些情况下，可发生天然被动免疫，如出生后的几个月内，新生儿血液中有母亲的 IgG 抗体，这些抗体是婴儿出生前通过胎盘由母体进入胎儿体内的，在胎儿免疫系统成熟过程中提供防病保护。表 22.3 中列出了主动免疫和被动免疫的比较对照。

表 22.3 主动免疫和被动免疫

主动免疫	被动免疫
接触抗原，注射抗原以获得免疫力	不接触抗原，注射抗体或抗原反应性 T 细胞获得免疫
由机体进行特异性反应来获得免疫力	在第二宿主中进行特异性免疫反应
通过刺激由抗原激活免疫系统，可能保持免疫记忆	不激活免疫系统，无免疫记忆
记忆细胞（如免疫接种）发生有效免疫应答	免疫力不能维持并迅速衰减
免疫状态数周后出现	免疫力迅速出现

在主动免疫中，抗原的引入使宿主体内产生根本性改变，即免疫细胞会产生大量的抗原特异性免疫效应分子（Ig）和细胞。第二次注入（追加）相同抗原后会引起更快更高滴度的再次应答（见 22.21 节）。主动免疫力常可保持终生，而被动免疫的个体永远不会得到比注入更多的抗体，且这些抗体会在体内迅速消失，当再次接触抗原时也不会引起再次应答反应。另外被动人工免疫通常用于治疗（therapeutic），以缓解患者遭受的疾病。例如，破伤风毒素（见下一节）主动免疫个体可对抗破伤风杆菌毒素的再次入侵，而注射破伤风抗血清的被动免疫个体，当接触破伤风杆菌时仍有感染的危险；相反，主动人工免疫常作为预防措施，以防止机体遭受病原体的再次侵袭。

免疫接种

用于人工主动免疫的材料通常为抗原或混合抗原，人们称为疫苗（vaccine）或免疫原，这种使机体引起免疫应答的过程称为免疫接种。用疫苗进行免疫接种以使其产生主动免疫可能会引起感染或其他副作用。为减少风险，常将病原体或其产物灭活，如很多免疫原都是由杀死后的病原体组成的。常用的方法有化学试剂处理法，如苯酚和甲醛；或采用物理方法如加热处理。甲醛也用来灭活病毒以用作疫苗，如索尔克疫苗(Salk polio vaccine，脊髓灰质炎疫苗)。还有外毒素引起的疾病，通常有活性的外毒素不能作为免疫原，许多外毒素可以用化学方法变性，保留其免疫原性，但除去其毒力。

这种变性后的外毒素称为类毒素（toxoid)。类毒素作为免疫原效果通常不如原来的外毒素，但它们很安全，并且可使用高剂量。

用活的细胞或病毒进行免疫接种通常比死的或灭活的材料更有效。活的疫苗一般使用分离的病原体的突变株；那些丧失毒力而保留了免疫原性的菌株称为减毒株（attenuated strain)（见 21.8 节)。当然这种病原体减毒株依然有毒性，有些个体特别是那些免疫损伤者，常常因免疫接种病原体而出现主动获得性疾病。由于接种疫苗而引发的严重疾病时有发生，如减毒的脊髓灰质炎病毒疫苗和天花病毒疫苗（见 25.11 节)。

用于人类的疫苗总结在表 22.4 中。大多数有效的病毒疫苗为减毒的疫苗。减毒疫苗有助于提供长久的 T 细胞介导免疫力，且可提供有力的抗体应答，当再次免疫时可产生更强的二次应答。然而要筛选稳定有效的减毒株并不容易，活的疫苗也有时限性，通常需要适当的冷冻保存；而杀死的病毒疫苗只能提供短时间的免疫反应，不能产生长久的免疫记忆。另一方面，细菌疫苗几乎都是灭活的菌体，灭活的细菌疫苗可诱导长期的抗体介导的免疫以保护机体免遭感染的危险。

表 22.4 用于人类感染性疾病的疫苗

疾病	疫苗种类
细菌性疾病	
炭疽病	类毒素
白喉	类毒素
破伤风	类毒素
百日咳	杀死的细菌（百日咳博德特氏菌 *Bordetella pertussis*）或无细胞蛋白质
伤寒	杀死的细菌（伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhia*）
副伤寒	杀死的细菌（副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphia*）
霍乱	杀死的细胞或细胞提取物（霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*）
鼠疫	杀死的细胞或细胞提取物（鼠疫耶尔森氏菌 *Yersinia pestis*）
结核	结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）减毒株
脑膜炎	由脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）分离来的纯多糖
细菌性肺炎	由肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）分离来的纯多糖
斑疹伤寒	杀死的细菌（普氏立克次氏体 *Rickettsia prowazekii*）
流感嗜血菌性脑膜炎	结合疫苗（流感嗜血杆菌 *Haemophilus influenzae* 多糖结合蛋白）
病毒性疾病	
黄热病	减毒病毒
麻疹	减毒病毒
流行性腮腺炎	减毒病毒
风疹	减毒病毒
脊髓灰质炎	减毒或灭活病毒
流感	灭活病毒
狂犬病	灭活病毒（人）或减毒的病毒（狗或其他动物）
天花	联合病毒（疫苗）（见 16.13 节）
甲型肝炎	重组 DNA 疫苗
乙型肝炎	重组 DNA 疫苗或灭活病毒
水痘	减毒病毒

免疫接种的实验操作

婴儿的天然被动免疫力是通过母亲的抗体穿过胎盘进入胎儿或通过初乳获得的。因此，婴儿在出生后 6 个月内可以相对地抵抗感染性疾病，但新生儿必须尽快进行免疫接种，尽可能地激发婴儿自身的主动免疫以替代母亲的被动免疫，以预防新生儿常见的严重感染。正如 22.10 节中讨论的那样，接触一次抗原不能产生高滴度的抗体，所以初次免疫接种后，要给以一系列的追加免疫接种使其产生再次应答和高滴度抗体。美国对儿童和新生儿接种疫苗程序列于图 22.24 中，其中大多数推荐的疫苗必须定期重复接种以保持有效的免疫力。

疫苗	推荐接种的年龄，美国 2004 年			
	出生后至 18 岁	19～49	50～64	大于 65
乙肝	□	△	△	△
白喉、破伤风、百日咳	□	□	□	□
乙型脑炎	□			
灭活的脊髓灰质炎疫苗	□			
麻疹、腮腺炎、风疹	□	△		
水痘	□	△	△	△
肺炎链球菌	□	△	△	□
甲肝	△	△	△	△
流感	△	△	□	□

□ 推荐所有年龄组。

△ 代表可能有风险者。

图 22.24　美国政府推荐儿童和新生儿接种

接种疫苗在控制感染性疾病方面的重要性目前已经被广泛认识。疫苗的有效使用能明显地降低疾病的发生率（图 26.13 和图 26.23）。然而通过疫苗获得免疫力的程度针对不同的个体及疫苗质量和用量的不同有很大差异。通过一次甚至一系列疫苗注射而获得终生免疫力是很难达到的，而且，通过接种疫苗诱导的免疫细胞会在体内逐渐消失。另一方面，在没有免疫接种的情况下通过自然感染的抗原刺激也会经常发生。自然感染所诱导的再次应答会导致抗体产生的增加。在完全不存在抗原刺激的情况下，有效的免疫时间会随着抗原的不同而有相当大的变化。例如，对破伤风类毒素的有效免疫可以达很多年，但使用流感病毒疫苗的免疫力在没有再次刺激的情况下一年或两年就消失了。接种疫苗不仅有益于个体而且也是有效的公共健康措施，因为大量的免疫人群可以有效防止疾病的扩散（见 25.5 节）。

被动免疫

被动免疫是通过注射已有的抗体而产生的免疫力，含有抗体的制品称为血清（serum）、抗血清（antiserum）或抗毒素（antitoxin）（对抗毒素的抗体）。抗血清可以从免疫的动物中获得，如马或有高滴度抗体的人，这些个体叫超免疫者。对抗血清或抗毒素

所含的抗体的滴度要进行标定，为中和体内存在的抗原必须注射足量的抗体。通过人工或自然接触各种抗原的诱导，血清中会含有多种抗体，因此这些个体的血清中分离的免疫球蛋白也可以用于被动免疫。

概念检查

感染性疾病的免疫力既可以是被动的也可以是主动的，既可以是天然的也可以是人工诱导的。免疫接种就是人工主动免疫的一种形式，它广泛用于感染性疾病的预防。用于免疫接种的制剂大多是减毒或灭活的病原体，或灭活的天然微生物产物。

◆ 举出一个天然被动免疫的例子。天然被动免疫怎样使得被免疫者受益？

◆ 举出一个人工免疫的例子。人工主动免疫怎样使得被免疫者受益？

22.14 免疫接种的新策略

大多数免疫接种制品是由完整的生物体或类毒素生产来的，正如前一节叙述的那样，此外还有其他几种方法用来生产适合免疫接种的抗原。

合成及基因工程的免疫制剂

最为简单的一种获得疫苗的新方法是合成肽（synthetic peptide）的应用。可通过合成肽生产并制造疫苗，这种合成肽相当于感染原表面的抗原决定簇。例如，目前我们已清楚了一种重要的动物病原体——口蹄疫病毒的表面具有免疫作用的蛋白质抗原的结构，已经合成出组成该蛋白质重要的抗原决定簇的 20 个氨基酸的多肽，并连接到一个合适的载体分子上。这种合成疫苗能够对口蹄疫病毒产生非常有效的中和抗体反应。然而与通常的方法一样，这种方法的主要问题是：必须清楚蛋白质抗原的全序列及蛋白质分子每个抗原的结构才能合成有效的疫苗，而对口蹄疫病毒来说，满足了这些条件；其他许多病原体也已经测序，为阐明其特异性抗原结构设计有效疫苗提供了必要的条件（见 15.3 节）。

此外，根据由病原体基因组提供的信息，可以采用分子生物学技术制备疫苗，如编码任何病毒抗原的基因都可以克隆到疫苗病毒的基因组中并使之表达。利用基因工程病毒疫苗进行接种同样可以诱导对所克隆的基因产物的免疫力。这种制品就是重组载体疫苗（recombinant-vector vaccine)。这种疫苗是依赖识别和克隆编码抗原的基因，也依赖所克隆的基因在疫苗病毒中的表达能力。一个有效的重组疫苗-狂犬病病毒疫苗目前已经成功地在动物中使用了。重组 DNA 疫苗的有关内容我们将在 31.6 节中讨论。

另一个重要的免疫接种策略就是如何生产重组 DNA 蛋白质作为免疫原。首先，必须将病原体基因克隆到合适的微生物宿主细胞中，并且宿主必须能表达病原体蛋白质。然后收获这种病原体蛋白质以用作疫苗。例如，乙肝病毒疫苗就是由酵母细胞表达的肝炎病毒表面主要蛋白质抗原（HbsAg)。

DNA 疫苗

新的免疫接种方法以所克隆的基因在宿主细胞中表达为基础。含有克隆 DNA 的细菌质粒通过肌肉注射到宿主动物中，几周后，宿主会通过 T_C 细胞、T_H1 细胞和抗体针对克隆 DNA 所编码的蛋白质发生免疫应答。宿主细胞获取 DNA，转录并翻译产生免疫原性蛋白质，这些蛋白质能刺激宿主发生常规的免疫应答。这些质粒就称为 DNA 疫苗。DNA 疫苗比常规免疫接种具有相当大的优势，由于这种方法通常只克隆和注射病原体的单一基因，因此不会像使用减毒疫苗那样有引起感染的危险。另外对特异性抗原的基因（如肿瘤特异性抗原）甚至一个独特的抗原决定簇的基因都可以克隆，可针对细胞特殊成分有目标地发生免疫应答。此外通过在基因结构中加入 MHC Ⅱ类基因的启动子，可以激发直接针对 APC 发生应答。这种启动子可以选择性地只在树突状细胞、B 细胞和巨噬细胞中表达 MHC Ⅱ 类蛋白，这样，表达、加工后的抗原可以被呈递在 MHC Ⅰ类和 MHC Ⅱ类蛋白上。由此可见，一个生物工程质粒可编码一种抗原，并能诱发完全的免疫应答，包括 T 细胞免疫和抗体免疫应答。

概念检查

应用分子生物学的方法替代传统的免疫接种，避免了机体与微生物的接触。而且，在某些情况下甚至只用蛋白质抗原。这些方法的应用可以提供安全的更有针对性的疫苗。

- 举出新的免疫接种方法的两个例子。
- 每个新的免疫接种措施与现行免疫接种方法相比有哪些进步。

V 免疫应答疾病

免疫反应有时会引起宿主细胞损伤和疾病，超敏反应（hypersensitivity）就是引起宿主损伤的不适当的免疫应答。根据产生疾病的抗原和效应因子机制的不同，超敏反应可分为不同的类型（表 22.5）。超抗原（superantigen）是由某些细菌和病毒产生的蛋白质，强烈地刺激免疫细胞，产生严重的炎症反应而导致宿主的损伤。

22.15 变态反应、超敏反应和自身免疫

由抗体介导的速发型超敏反应（immediate hypersensitivity）通常叫变态反应（allergy）。由细胞介导的迟发型超敏反应（delayed-type hypersensitivity）也可以引起疾病。直接针对自身抗原而发生的疾病叫自身免疫性疾病（autoimmune disease）。

速发型超敏反应（Ⅰ型超敏反应）

速发型超敏反应或Ⅰ型超敏反应是由包被 IgE 抗体的肥大细胞所释放的血管活性物质介导的（表 22.5），速发型超敏反应通常称为变态反应，常发生在接触抗原后的几分

钟内。根据抗体和抗原的不同，速发型超敏反应可能是很轻微的，也可能是非常严重的有生命危险的反应，如已知的过敏反应（anaphylaxis）。引起Ⅰ型超敏反应的抗原叫变应原（allergen）。

表 22.5　超敏反应

类型	特征	免疫机制	潜伏期	病例
Ⅰ型	速发型	IgE 致敏的肥大细胞	数分钟	对蜂毒反应，枯草热
Ⅱ型	细胞毒型	IgG 与细胞表面抗原相互作用	数小时	药物反应（青霉素）
Ⅲ型	免疫复合物型	IgG 与可溶性或循环抗原相互作用	数小时	红斑狼疮
Ⅳ型	迟发型	T_H1 炎症细胞	数天	结核菌素试验

表 22.6　速发型超敏反应的变应原

花粉和真菌孢子（枯草热）
昆虫毒素（蜂毒）
某些食物
动物皮屑
灰尘中的螨

大约 20％的人会受到速发型超敏反应的威胁，包括对特殊的变应原（如花粉、动物皮屑、某些食物及各种其他物质）所引起的超敏反应（表 22.6）。几乎所有的变应原都会接触黏膜的表面，如肺、胃肠道黏膜。变应原在黏膜表面刺激 T_H2 细胞产生细胞因子，这些细胞因子又诱导 B 细胞产生 IgE 类抗体。IgE 类抗体不像循环抗体 IgG 或 IgM，变应原特异性的 IgE 抗体能通过恒定区的细胞膜结合位点（见 22.8 节）与肥大细胞表面的 IgE 受体结合（图 22.25）。肥大细胞是不运动的粒细胞（见 22.2 节），分布在全身各个部位的毛细血管邻近的结缔组织中。当再次接触同一变应原时，变应原即与结合在肥大细胞上的 IgE 分子结合，当两个或两个以上 IgE 分子被抗原桥连在一起时，触发肥大细胞释放数种可溶性变态反应介质，这个过程叫脱颗粒（degranulation）。这些介质会在几分钟内引起变态反应症状，一般情况下，这些症状相对是短暂的，但一旦被变应原致敏，机体以后每次接触这一抗

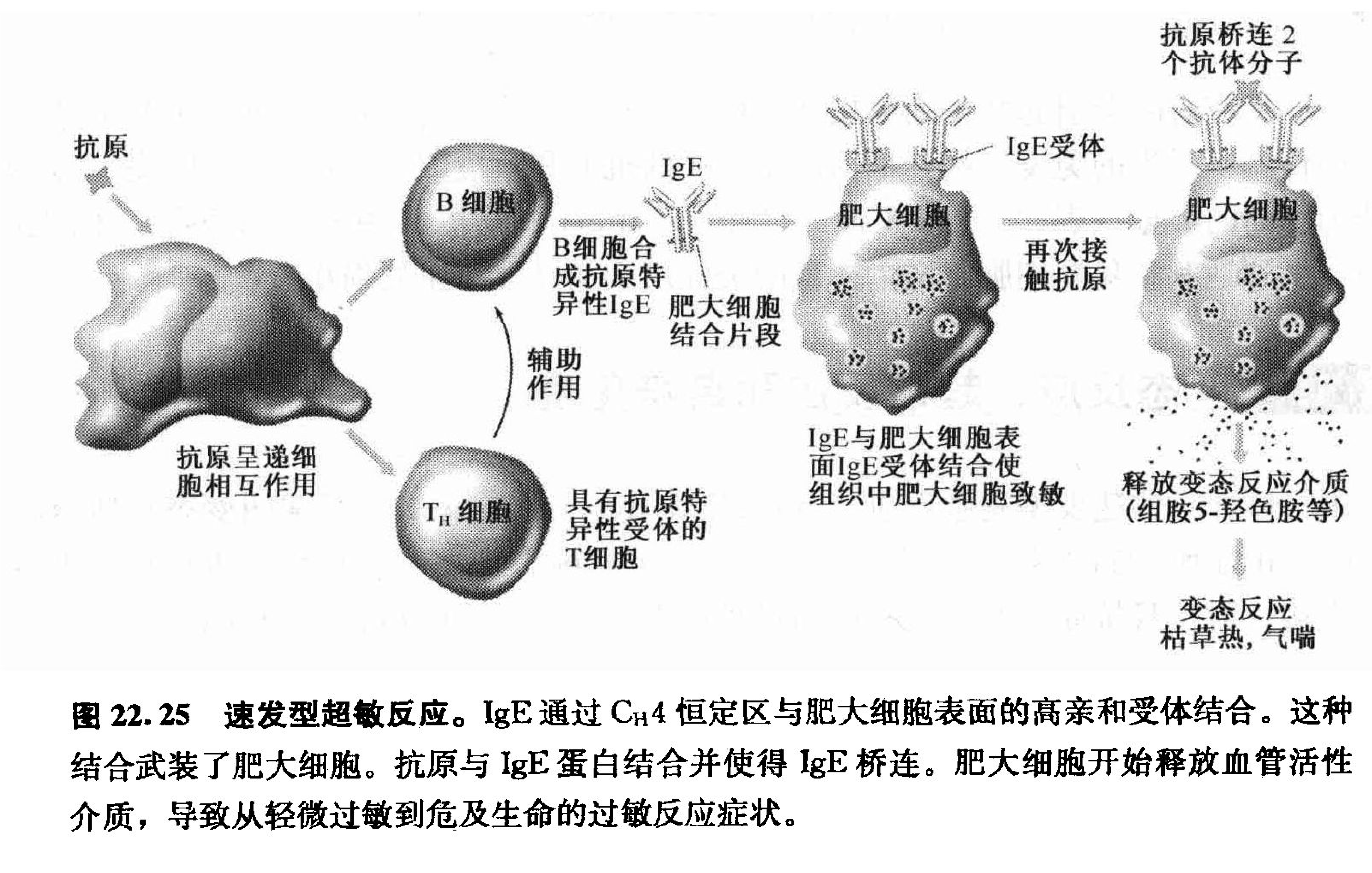


图 22.25　速发型超敏反应。 IgE 通过 C_H4 恒定区与肥大细胞表面的高亲和受体结合。这种结合武装了肥大细胞。抗原与 IgE 蛋白结合并使得 IgE 桥连。肥大细胞开始释放血管活性介质，导致从轻微过敏到危及生命的过敏反应症状。

原时都可能产生应答。

肥大细胞释放的主要化学介质有组胺、5-羟色胺、被修饰的氨基酸，它们会引起血管迅速扩张、平滑肌收缩，导致系统性过敏反应症。包括血压下降、支气管水肿引起的严重呼吸窘迫、皮肤红斑、红肿、黏液产生、打喷嚏、痒、眼泪等。如果情况严重，不及时使用肾上腺素立即治疗平滑肌收缩、增加血压并促进呼吸，很可能因为过敏性休克引起死亡。幸运的是，大多数变态反应都是局部轻度过敏，症状大多为瘙痒、流泪等。轻微的症状可以用抗组胺药物治疗，以中和过敏介质组胺（antihistamine）。对比较严重的也可以用普通抗炎药物（如类固醇）来治疗。还可以通过逐步增加变态原的剂量进行免疫接种使得抗体产生由 IgE 转换为 IgG。IgG 与抗原反应防止了 IgE 的作用。因此可减少过敏症状，抑制 IgE 的产生的过程称为脱敏作用（desensitization）。

迟发型超敏反应（Ⅳ型超敏反应）

Ⅳ型超敏反应或迟发型超敏反应（delayed-type hypersensitivity，DTH）是由细胞介导的超敏反应，其特点是由炎症细胞 T_H1 产生的炎症反应造成机体组织损伤（表 22.5）。一般在第二次接触抗原后的数小时开始出现症状，24～48h 后反应最强烈。典型抗原包括某些微生物、少数自身抗原（表 22.7）及一些化学物质，这些物质与皮肤共价键结合，产生一些新的抗原。对这些新出现抗原的超敏反应称为接触性皮炎（contact dermatitis）。还有皮肤对毒戚树（图 22.26）、珠宝饰品、化妆品、乳胶及其他化学品的反应都属于这一类。在接触抗原后的数小时内，接触部位的皮肤感到瘙痒，并出现红肿等普通炎症反应的特征。局部组织被破坏常以起疱的形式出现，这是免疫细胞活化造成的，再次接触抗原 24～48h 反应出现高峰。对结核病原体结核分枝杆菌的免疫就是迟发型超敏反应的一个典型病例（图 22.24），这一保护性细胞免疫应答是由 Robert Koch 在对结核病的经典研究中发现的（见 1.6 节），并对其进行了深入的研究。当来源于结核菌的抗原再次注射到已注射过结核分枝杆菌的动物体内时，会引发这一特征性的皮肤反应，并在 24～48h 后达到高峰，这与 IgE 介导的速发型超敏反应接触抗原后几分钟内发生的皮肤反应是完全不同的。在注射抗原的部位，T_H1 细胞被激活并释放细胞因子，这些细胞因子吸引并活化大量的巨噬细胞，这些巨噬细胞在注射部位产生皮肤反应。反应会出现以硬结（硬化）、水肿（肿胀）、红斑（红肿）、疼痛和局部发热为特征的普通炎症反应症状（见 22.3 节）。然后活化的巨噬细胞吞噬并破坏入侵抗原。这种皮肤反应是结核菌素试验的基础，用来检测以前是否接触过结核分枝杆菌（图 22.26）。

表 22.7 人类自身免疫病

疾病	受累器官或部位	机制
青少年糖尿病(胰岛素依赖性糖尿病)	胰腺	抗朗格罕氏胰岛细胞表面抗原和细胞质抗原的自身抗体
重症肌无力	骨骼肌	抗骨骼肌表面乙酰胆碱受体的自身抗体
古德帕斯彻综合征	肾脏	抗肾小球基底膜的自身抗体
类风湿关节炎	软骨	抗自 IgG 的自身抗体，它们形成的复合物沉积在关节组织中，导致炎症和关节损伤

续表

疾病	受累器官或部位	机制
桥本病	甲状腺	抗甲状腺表面抗原的自身抗体
男性不育(某些病例)	精子细胞	自身抗体凝集宿主精子细胞
恶性贫血	内因子	自身抗体阻止对维生素 B_{12} 的吸收
系统红斑狼疮	DNA、心磷脂、核蛋白、凝血因子	大量自身抗体针对多种细胞组分发生应答
原发型肾上腺皮质萎缩	肾上腺细胞	抗肾上腺细胞抗原的自身抗体
变应性脑脊髓炎	脑	针对脑组织发生细胞介导的应答
多发性硬化症	脑	针对中枢神经系统发生细胞介导和自身抗体介导的应答

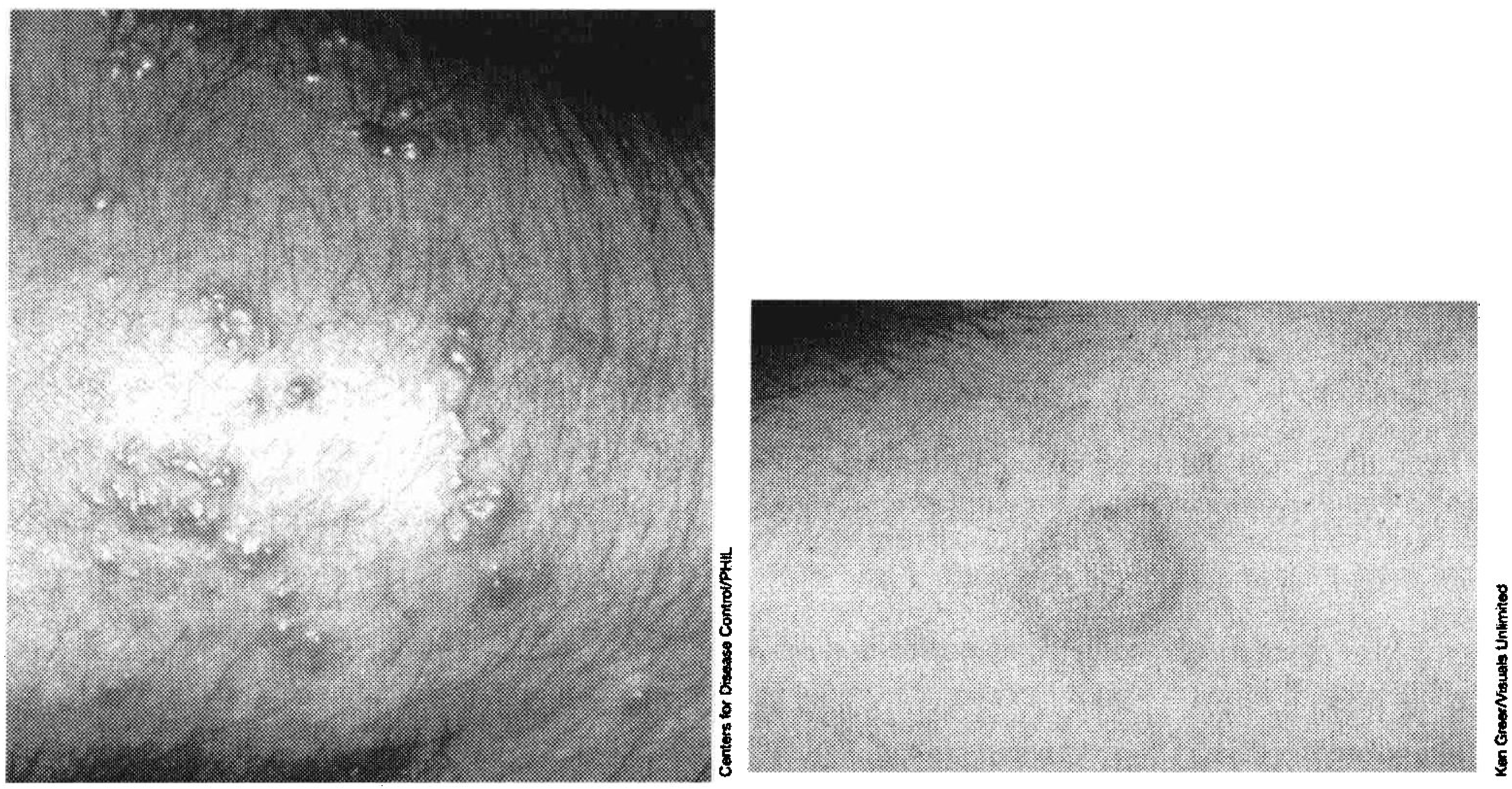


图 22.26　细胞介导免疫。(a)因接触毒常春藤而引起的臂部水泡,致敏的机体在接触槭树科植物 24～48h 后,反应会达到高峰。(b)结核菌素阳性实验,典型的迟发型超敏反应,炎症反应面积直径可达到 1.5cm。两种反应都是由抗原特异性 T_H1 细胞的作用引起的。

许多种类的微生物感染都会引起迟发型超敏反应,除结核以外,还包括麻风病、布鲁氏病、鹦鹉热(这些都是由细菌引起)、流行性腮腺炎(由病毒引起)、球孢子菌病、组织胞浆病和酵母菌病(由真菌引起)等。所有这些细胞免疫反应中,注入病原体来源的抗原都会出现类似结核菌素试验一样可见的抗原特异性皮肤反应,表明以前接触过这种病原体。

另外,T_H1 介导的迟发型超敏反应可能还包括针对自身抗原的自身免疫应答。例如,过敏性脑炎和Ⅰ型(青少年型)糖尿病都有 T_H1 的参与(表 22.6)。不过,很多自身免疫疾病是由抗体介导的,这在下面将会讨论。

自身免疫病(Ⅱ、Ⅲ型超敏反应)

在淋巴细胞成熟过程中,那些针对自身抗原反应的 T 和 B 细胞通常被限制。然而,

在某些个体中，这些 T 细胞和 B 细胞可能被活化以产生抗自身蛋白质的免疫反应，导致自身免疫病(表 22.7)。根据疾病特点，自身免疫性疾病可由以自身抗原为靶标的自身抗体(autoantibody)引起，或以抗自身组织的细胞免疫而引起。某些自身免疫病具有很高的器官特异性[如 Hashimoto 氏病(Hashimoto's disease)]，产生抗甲状腺球蛋白的自身抗体。这种疾病会影响甲状腺的功能，并被分类为Ⅱ型超敏反应:抗体与宿主细胞表面抗原相互作用，并引起组织损伤(表 22.5)。这种情况下，抗甲状腺球蛋白抗体能固定补体，会引起甲状腺细胞的损伤。在青少年糖尿病(juvenile diabetes)中，也会观察到在胰腺中产生了抗胰岛素产生细胞的抗体，但最初的组织损伤是由 T_H1 细胞介导的炎症反应引起的。

系统型红斑狼疮(systemic lupus erythematosis, SLE)是Ⅲ型超敏反应的很好例证：抗体与可溶性蛋白质结合，形成不溶性免疫复合物，导致补体沉积及炎症。因此，Ⅲ型超敏反应是免疫复合物疾病(immune complex disorder)(表 22.5)。这种疾病及其他类似疾病都会产生大量的抗自身可溶性循环抗原的自身抗体。SLE 患者中，抗原包括核蛋白和 DNA。病症由循环的抗原-抗体复合物引起，复合物沉积在机体不同的器官(如肾、肺和脾)。补体的介入导致了局部的细胞溶解和炎症反应，补体沉积部位的细胞损伤通常很严重。

因为是组织器官的产物，器官特异性自身免疫疾病在临床上有时比较容易控制，如自身免疫性甲状腺功能减退病中的甲状腺素以及青少年糖尿病患者中的胰岛素可以用其他来源的纯品对患者进行补给。SLE 及其他疾病常累及各种器官，一般用免疫抑制疗法可以控制病情(如使用类固醇类药物)。但类固醇治疗也有风险，一般免疫抑制的使用都会增加机会性感染的风险。

遗传因素对自身疾病的发病率、疾病类型、严重程度等方面都具有重要的影响。很多自身免疫病与某些主要组织相容复合体抗原(MHC)的存在具有很强的相关性(见 22.6 节和 27.3 节)。通过在小鼠身上对某些典型的自身免疫疾病进行的研究证实了这种遗传关系的存在。但引发自身免疫还有其他的一些必要条件，例如性别——女性的 SLE 患者是男性的 20 倍以上。

概念检查

外来的抗原会诱导细胞或体液免疫导致宿主细胞或组织的损伤，产生超敏反应。针对自身抗原也产生免疫应答发生自身免疫，导致宿主组织的损伤。

- 区别速发型和迟发型超敏反应的相关抗原和效应分子。
- 掌握两类主要自身免疫病的相关抗原及免疫效应因子。

22.16 超抗原

在第 21 章中，我们已经就不同类型细菌毒素的作用机制进行了介绍。大多数毒素与宿主细胞直接作用而引发组织损伤。例如，内毒素可直接作用于各种类型细胞，引起内源性热源及其他可溶性介质的释放，使机体发热及发生通常的炎症反应(见 22.2 节)。大多

数外毒素也可以直接作用于细胞造成细胞的损伤(见 22.10 节和 22.11 节),但是有些称为超抗原的外毒素,不直接作用于宿主细胞,而是以新的免疫机制引起宿主组织大量的损伤。

超抗原对 T 细胞的活化

超抗原是指能诱导高强度免疫应答的蛋白质,因为它能活化比正常免疫应答更多的 T 细胞。超抗原在与 TCR 结合模式上与普通抗原不同。大多数超抗原由病毒和细菌产生,特别是链球菌和葡萄球菌能产生多种不同的且非常有效的超抗原(表 21.4)。

通常的外源性抗原与 TCR 可变区的抗原结合位点结合,在典型的免疫应答中,与抗原作用的 T 细胞不足全部有效 T 细胞的 0.01%(见 22.5 节)。而超抗原的结合位点在 TCR 的 Vβ 区,位于抗原特异性 TCR 结合位点的外侧。超抗原可与有共同结构的所有 TCR 结合,很多不同的 TCR 享有相同的抗原结合点的外侧结构。在某些情况下,超抗原的暴露可能引起 5%至 25%的 T 细胞的结合及活化。超抗原也可以与 APC 表面的 MHC Ⅱ类分子结合,结合在特异性位点外侧抗原肽结合的位点(图 22.27)。这些细胞表面相互作用,像普通抗原呈递作用一样(见 22.7 节),活化大量的 T 细胞,接着活化的 T 细胞产生大量的细胞因子,然后细胞因子又刺激其他细胞,特别是巨噬细胞和其他吞噬细胞。由于细胞因子的大量产生,所以细胞介导的应答以系统炎症反应为特征,常导致发热、腹泻、呕吐、分泌黏液及系统性休克。在极端情况下,接触超抗原可能是致命的,超抗原休克与第 22.3 节中讨论的败血性休克实际上无本质的区别。

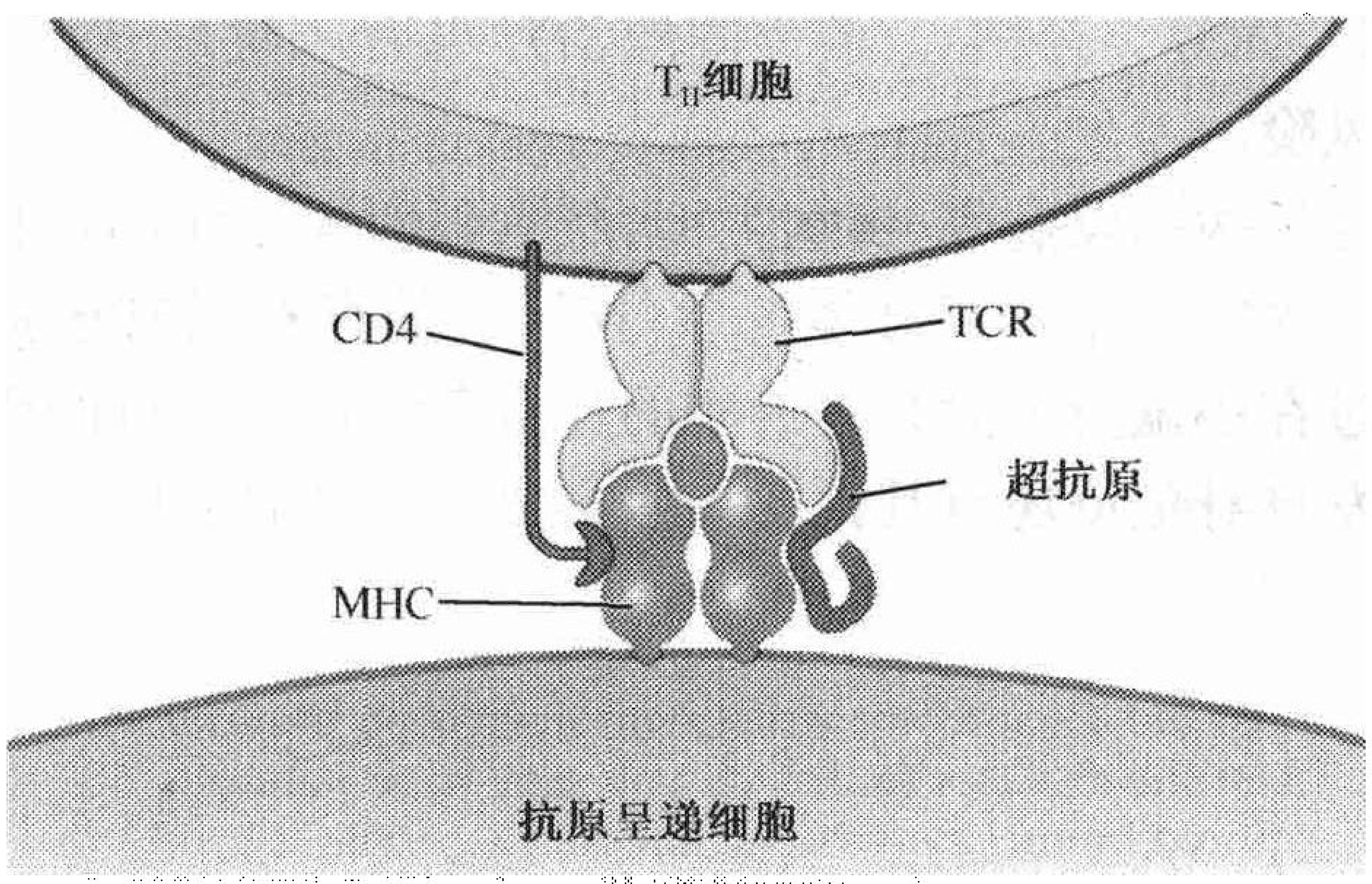


图 22.27　细菌的超抗原。超抗原能与 MHC 蛋白和 TCR 正常结合位点的外侧结合。由于超抗原能结合包括 MHC 和 TCR 在内的两个区域,所以超抗原能够与大多数细胞相互作用,刺激大量的 T 细胞活化,细胞因子的释放,甚至系统炎症。

有几种疾病可以认为是超抗原引起的,以前我们已经提到过(见 21.10 节和 21.4 节)。值得注意的超抗原病包括金黄色葡萄球菌引起的食物中毒,其特征为发热、呕吐、腹泻,是由作为葡萄球菌内毒素之一的超抗原引起的。金黄色葡萄球菌也产生超抗原反应性中毒性休克综合征(toxic shock syndrome)。化脓链球菌产生的红疹毒素,也会引起超抗原应答性猩红热(见 26.5 节)。

概念检查

超抗原能以不同的方式结合并活化大量 T 细胞。超抗原活化的 T 细胞能够产生以严重的炎症反应为特征的系统性疾病。

- ◆ 辨别正常的 T 细胞活化过程和超抗原活化 T 细胞的区别。
- ◆ 了解超抗原在 T 细胞和 APC 上的结合位点。

复习题

1. 在免疫应答中的吞噬细胞和抗原特异性细胞的来源是什么？描述 B 细胞和 T 细胞的成熟过程。(见 22.1 节)
2. 什么是病原体相关分子模式？它是如何被模式识别分子识别的？这些分子间相互作用的意义是什么？(见 22.2 节)
3. 解释吞噬细胞如何吞噬并杀死微生物的？特别是氧依赖途径。(见 22.3 节)
4. 试述获得性免疫应答的最重要特性是什么。(见 22.4 节)
5. 什么样的分子能诱导免疫应答？这些分子必须具备什么性质？(见 22.5 节)
6. 描述Ⅰ类和Ⅱ类主要组织相容性复合体(MHC)蛋白的基本结构，它们的功能有何不同？(见 22.6 节)
7. 指出 T_C细胞和 NK 细胞之间的区别，它们各自的活化信号是什么？(见 22.7 节)
8. T_H细胞和 T_C细胞有何不同？区别 T_H1 和 T_H2 细胞的功能。(见 22.8 节)
9. 描述 5 大类抗体的不同结构和功能。(见 22.9 节)
10. 了解参与 B 细胞产生抗体的细胞之间的相互作用。(见 22.10 节)
11. 描述补体的级联系统。补体蛋白间相互作用的顺序重要吗？为什么？了解补体活化的替代途径。了解补体活化的甘露聚糖结合的凝集素途径。(见 22.11 节)
12. 列举为了预防疾病你自己已经进行的免疫接种。列举你对哪些疾病具有天然免疫力。(见 22.12 节和 22.13 节)
13. 描述至少一种我们所介绍的利用生物技术的新兴免疫接种策略。这种策略与传统的免疫接种策略有何不同？(见 22.14 节)
14. 从免疫效应因子、靶组织、抗原和临床症状等方面解释速发型和迟发型超敏反应的区别。(见 22.15 节)
15. 描述超抗原活化 T 细胞的机制。超抗原和普通抗原对 T 细胞的活化有何不同？(见 22.16 节)

应用题

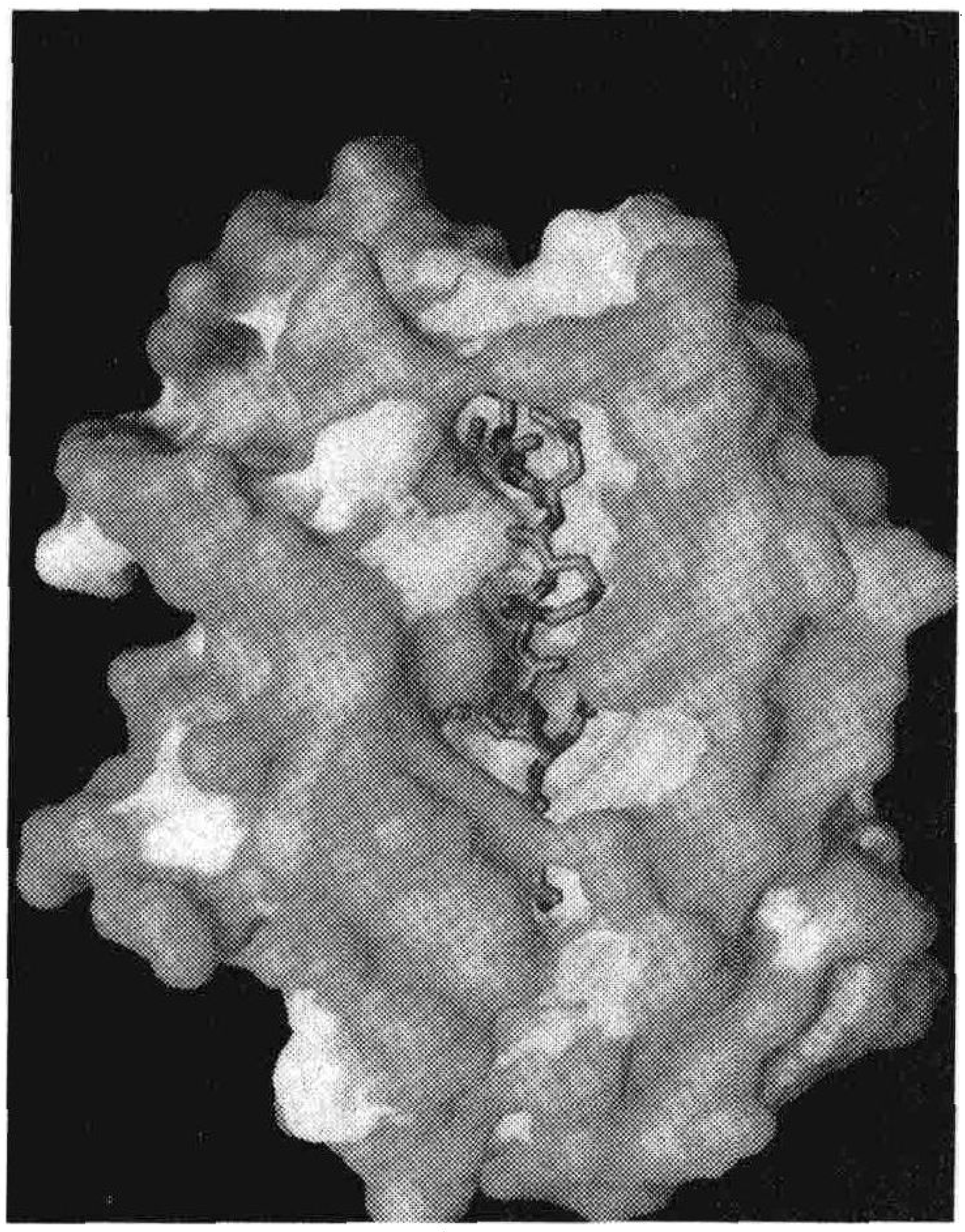
1. 如果一个个体对病原体的吞噬作用无适应性能力，将会有怎样的潜在危险？他能在普通环境如校园中生活吗？什么缺陷会引起吞噬细胞吞噬功能缺失？请解释原因。

2. 对获得性免疫应答来说特异性和耐受性是必需的，但免疫记忆似乎没那么重要，至少看上去是这样。解释免疫记忆的防御作用及记忆细胞如何产生及维持才能在长时间内保护宿主。
3. 如果一个体有遗传缺陷，导致没有呈递抗原给 T_C 细胞的能力，请描述此人将会出现哪些潜在的危机。如果没有能力呈递抗原给 T_H 细胞，或是同时呈递给 T_C 和 T_H 细胞呢？在每一个体中，哪些分子可以是用来防御的？任何人都可以生活在正常环境中吗？解释为什么。
4. IgA 类抗体可能比 IgG 类抗体更普遍，请解释这是为什么。这对宿主来说有何好处。
5. 补体被认为是循环体液防御机制的一部分，你同意这种看法吗？为什么？如果一个人缺少了补体 C3、C5、备解素（代替途径）、MBL 会产生什么后果？
6. 许多感染性疾病至今还没有有效的疫苗，请选择几种这样的疾病（如艾滋病、疟疾和感冒），并解释为什么现行的预防接种对它们是无效的。并针对您选择的疾病提出一些可用于免疫接种的可替代的方法。

（张心平 译，白 钢 校）

23

分子免疫学



免疫识别即细胞表面分子间的相互作用，存在于所有的细胞表面的主要组织相容性蛋白质，与肽结合之后形成复合物，然后再与 T 细胞受体结合，从而引发抗原特异性的免疫应答。

词汇表

限制位（agretope）：抗原结构中能识别并结合 MHC Ⅱ类分子的部位

无反应性（anergy）：由于效应细胞的中性化而引起的针对特异性抗原不能产生免疫应答的现象

抗体（antibody）：也称为免疫球蛋白，是由 B 细胞产生的能与抗原相互作用的可溶性蛋白质

细胞凋亡（apoptosis）：细胞的程序性死亡

趋化因子（chemokine）：各种细胞所产生的能调节炎症反应和靶细胞免疫活性的小分子可溶性蛋白质

MHC Ⅰ类蛋白（class Ⅰ MHC protein）：位于所有有核脊椎动物细胞表面的抗原呈递蛋白

MHC Ⅱ类蛋白（class Ⅱ MHC protein）：位于巨噬细胞、B 细胞、树突细胞表面的抗原呈递蛋白

克隆缺失（clonal deletion）：在胸腺 T 细胞选择时，杀死无用的或自身免疫性细胞的过程

克隆选择（clonal selection）：抗原刺激后的单个 T 细胞或 B 细胞产生自身拷贝的过程

互补决定区（complementarity-determining region，CDR）：又称超变区，是抗体分子或 T 细胞受体（TCR）的多肽链中能与抗原结合的片段

细胞因子（cytokine）：由免疫细胞或其他细胞分泌的能够对其他细胞发挥各种不同的生物学效应的可溶性蛋白质分子

结构域（或称功能域）（domain）：蛋白质分子的折叠和功能单位

表位（epitope）：又称抗原决定簇，是抗原分子中被抗体、B 细胞受体（BCR）或 TCR 所识别的部位

人白细胞抗原（HLA）：人的主要组织相容性抗原

高变区（hypervariable region）：指抗体和 TCR 多肽链的可变区中氨基酸序列变异最为集中的 3 个区域，其中的氨基酸残基参与构成抗原的结合部位，故又称决定簇互补区（CDR）

免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）：也称为抗体分子，是由 B 细胞产生的能与抗原相互作用的可溶性蛋白质

免疫球蛋白基因超家族（immunoglobulin gene superfamily）：与免疫球蛋白的进化、结构和功能相关的基因家族

主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）：负责编码细胞表面重要蛋白质的基因区域，所编码蛋白质对抗原的加工和呈递是非常重要的

基序（motif）：存在于与 MHC 蛋白结合的所有肽抗原中的氨基酸序列

负选择（negative selection）：在 T 细胞选择过程中，那些与自身抗原相互作用的 T 细胞在胸腺中被清除的过程

病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP）：病原或病原代谢物中能被模式识别分子识别的结构

模式识别分子（pattern recognition molecule，PRM）：能识别病原相关分子模式的蛋白质，如微生物细胞表面的构成成分

多态性（polymorphism）：指遗传基因在群体中的变异性

正选择（positive selection）：在 T 细胞选择的过程中，促进与自身 MHC 相互作用的 T 细胞的生长和发育的过程

体细胞高变（somatic hypermutation）：指某些体细胞在增殖过程中发生基因突变的频率明显高于平均水平的现象

T细胞受体（T-cell receptor，TCR）：T细胞表面的抗原特异性受体蛋白
耐受（tolerance）：对特异性抗原无免疫应答的状态
Toll样受体（Toll-like receptor，TLR）：指位于噬菌细胞表面的与果蝇Toll样受体的结构和功能相关的模式识别分子

我们已经了解，免疫应答的过程借助于许多蛋白质与病原体相互作用。本章将重点讨论这些蛋白质及其复合物分子的相互作用，主要介绍三方面：①模式识别分子，即在天然免疫应答中与抗原相互作用的蛋白质；②获得性免疫应答和免疫球蛋白超家族，其重点是主要组织相容性复合物蛋白、T细胞受体、免疫球蛋白及所有直接与抗原相互作用的蛋白质；③控制细胞信号转导和激活免疫应答的分子及其相互作用关系。

Ⅰ 受体和免疫性

23.1 先天免疫和模式识别

吞噬细胞是指同巨噬细胞和嗜中性粒细胞一样能引起先天免疫的细胞，一般能导致病原体的溶解、吞噬和消灭作用。吞噬细胞能分泌表达许多蛋白质与不同类型的病原分子相互作用。

病原相关分子模式（PAMP）、模式识别分子（PRM）和Toll样受体（TLR）

吞噬细胞通过其具有的许多在进化中被保留下来的特殊的膜结合蛋白，即模式识别分子（pattern-recognition molecule，PRM）来识别病原体。一个PRM就是一个能识别特定的PAMP（如微生物细胞表面结构的成分）的蛋白质。在补体系统的章节中（见22.11节）我们已经讨论过两种PRM，即甘露糖结合凝集素（mannan-binding lectin，MBL）和备解素（propertin，P因子）。这些PRM能激活补体系统并能引起靶细胞的裂解或发生调理作用。MBL和备解素大多以同样的方式与微生物细胞表面的物质结合，并通过MBL或旁路途径来激活补体（见22.11节）（表23.1）；这些蛋白质的靶标为病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern，PAMP），即在特定生物体或感染源中发现的独特的结构成分。甘露糖是被MBL识别的PAMP，是细菌多聚糖中的重复亚单位。备解素能够识别许多酵母（真菌）病原体细胞壁的成分中的一种蛋白质与多聚糖的复合物——酵母聚糖。

其他PRM也是膜整合蛋白质，特定地存在于吞噬细胞上。在哺乳动物中，进化和功能相关的跨膜蛋白被称为Toll样受体（Toll-like receptor，TLR），该受体最早发现于果蝇（*Drosophila*）中。目前，已知的人的Toll样受体有10种，可识别病毒、细菌和真菌的PAMP，包括病原细胞表面分子和一些可溶性的病原代谢物。表23.1总结了一些已知的Toll样受体及PAMP与不同PRM之间的相互作用。

表 23.1　天然免疫应答的受体和靶点

模式识别分子（PRM）	病原相关分子模式（PAMP）	相互作用的结果
MBL（甘露糖结合凝集素）（可溶）	含甘露糖的微生物细胞表面成分	通过 MBL 途径互补并激活（见 22.11 节）
备解素（可溶）	酵母聚糖和其他微生物细胞表面分子复合物	通过旁路途径激活补体（见 22.11 节）
TLR-2[a]（Toll 样受体 2）	革兰氏阳性菌上的肽聚糖及酵母细胞壁上的酵母聚糖	对于所有的 TLR，与病原限制的大分子相互作用能产生信号转导，从而激活吞噬细胞引起炎症反应，并摧毁病原体
TLR-3	dsRNA（病毒的复制）	
TLR-4	LPS（脂多糖）	
TLR-5	细菌表面的鞭毛蛋白	
TLR-9	细菌中的非甲基化的 CpG 寡核苷酸	

a. Toll 样受体几乎都存在于吞噬细胞中。

一些 TLR 可以应答一个以上的 PAMP。例如，TLR-4 参与革兰氏阴性 LPS 的先天免疫，也应答于被称为热休克蛋白（heat shock protein，HSP）的宿主应答分子。LPS 和 HSP 均不直接与 TLR-4 作用，而是通过一个受体蛋白与 TLR-4 作用。然而在有些情况下，Toll 样受体可直接与 PAMP 作用，如鞭毛蛋白和 TLR-5 的结合。

PAMP 与吞噬细胞 Toll 样受体直接或间接作用，结果引发穿膜的信号转导，启动各样蛋白质的翻译，引起吞噬细胞的活化，最终导致吞噬作用、病原体的清除或炎症的产生。

概念检查

PAMP 和 PRM 间的相互作用是先天免疫应答的一部分。PRM 与不同病原体的 PAMP 相互作用，可激活补体和吞噬细胞的效应机制，从而锚定并摧毁病原体。

◆ 辨别 MBL 途径的靶点及对目标病原体的破坏。

◆ 辨别含有 TLR-4 的细胞及被这种细胞识别的细菌 PAMP。

知识窗：Toll 样受体和果蝇"一个古老的对感染的应答"

黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）作为模式生物已有近一个世纪的历史。现在，无脊椎动物果蝇的免疫系统的详细情况又为观察脊椎动物的先天免疫机制提供了帮助，参与果蝇免疫过程的一些蛋白质作为侵入细菌的重要受体，发挥模式识别分子（PRM）的作用。果蝇 Toll 样受体作为一种细胞表面受体是最好的例子，它参与果蝇背腹轴的形成发育及先天免疫应答。

Toll 免疫信号通路起始于病原体或其分子与 Toll 蛋白的相互作用。Toll 蛋白是吞噬细胞的表面受体，但果蝇的 Toll 蛋白却不直接与病原体相互作用。病原体的表面分子，例如，革兰氏阴性菌的脂多糖（见 4.9 节）与一种或多种附属蛋白质（见人类的 TLR-4 系统图）结合后，启动信号转导，然后 LPS-附属蛋白质复合物再与 Toll 结合。膜整合 Toll 蛋白将信号传递到细胞质，激活核转录因子，并诱导一些抗菌肽基因的转录。在果蝇中，Toll 相关性转录因子能诱导抗菌肽的表达，这些抗菌肽由肝状脂肪体（liver-like fat body）产生，包括 drosomycin（一种抗真菌肽）、双翅抗菌肽（diptericin，抗革兰氏阴性菌）和防卫素（defensin，抗革兰氏阳性菌），它们被释放到果蝇的循环系统中，攻击靶生物并引起溶菌作用。

在结构上，Toll 样蛋白与血凝素有关系。血凝素是指包括脊椎动物和植物的所有多细胞生物中存在的一类能特异性地与寡糖单体相作用的蛋白质。在人体中，Toll 样受体（TLR）能与许多种病原相关分子模式（PAMP）反应，如表 23.1 所示，人的 TLR-4 通过与 LPS 相互作用产生抗革兰氏阴性菌的先天免疫。同果蝇 Toll 样蛋白一样，TLR-4 不能与病原体或 LPS 直接作用，而是通过一种可溶性的宿主防御蛋白 LPS 结合蛋白（LBP）与循环中的 LPS 相作用形成复合物 LPS-LBP，该复合物与吞噬细胞表面的 CD14 蛋白结合，释放 LBP，形成 LPS-CD14 复合物，该复合物再与 TLR-4 结合，通过跨膜的 TLR-4 蛋白启动信号通路，激活核转录因子 NFκB，NFκB 可激活细胞因子和其他参与宿主应答的吞噬蛋白的转录，最后被活化的吞噬细胞摧毁病原体，同时能释放炎症蛋白。

在功能、进化和结构上，果蝇的 Toll 样蛋白是包括人类在内的高等脊椎动物的 Toll 样受体的祖先。Toll 蛋白及其配体是先天免疫系统在进化上古老并高度保守的成分，存在于多种动物甚至是植物中。

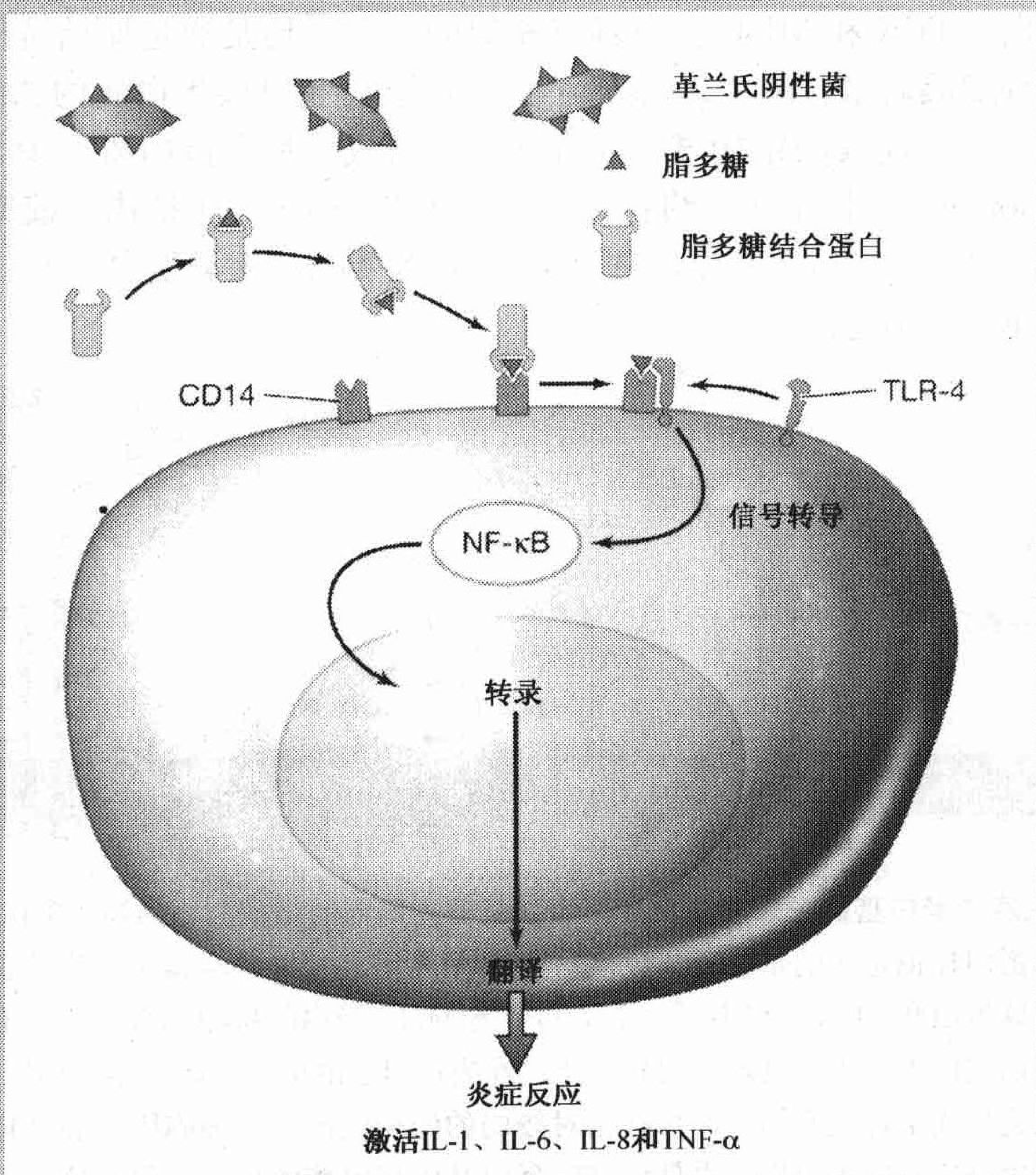


图　人类巨噬细胞中 TLR-4 的活化。革兰氏阴性菌释放的脂多糖与体液中的 LPS-结合蛋白（LBP）结合。LPS-LBP 复合物再与 CD14 结合，LBP 被释放出来，LPS-CD14 复合物与 TLR-4 结合，所产生的 TLR-4-LPS-CD14 复合物通过 TLR-4 诱导信号转导，激活 NFκB（一个转录因子），导致编码 IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF-α 等炎症因子和趋化因子的基因的转录和翻译。这些媒介物可以激活其他细胞，产生炎症反应，并最终摧毁病原体（见 22.2 节和 22.3 节）。

23.2 适应性免疫和免疫球蛋白超家族

免疫球蛋白基因超家族（immunoglobulin gene superfamily）由与免疫球蛋白基因和与其具有相似的结构、进化和功能的基因和蛋白质组成。参与获得性免疫的抗原结合蛋白被认为是这个超家族的成员。

如第 22 章所述，在获得性免疫应答过程中，虽然免疫球蛋白（immunoglobulin）、TCR（T-cell receptor）和 MHC 蛋白 3 种不同的细胞表面蛋白质都能特异性地与抗原结合，但其分布、结构和功能有所不同。MHC 蛋白主要位于抗原呈递细胞（APC）和靶细胞的表面，可将抗原呈递给 T 细胞表面的 TCR（见 22.6 节）；而 B 淋巴细胞表面的免疫球蛋白可直接与细胞外的抗原作用（见 22.9 节）。

抗原结合蛋白质的结构和进化

免疫球蛋白、TCR 和 MHC 蛋白具有相似的结构，均是通过原始抗原受体基因的复制和选择过程发展而来。图 23.1 显示了免疫球蛋白超家族蛋白质的选择过程，这些蛋白质通常由几个不连续的结构域（domain）所组成，每个蛋白质至少含有一个恒定区（constant domain），恒定区大约有 100 个氨基酸，内含一个链内二硫键连接的 50～70 个氨基酸组成的环肽。β-2 微球蛋白（β_2m）作为 MHC Ⅰ类蛋白（见 23.2 节）的一部分，通常由单一的恒定区组成。

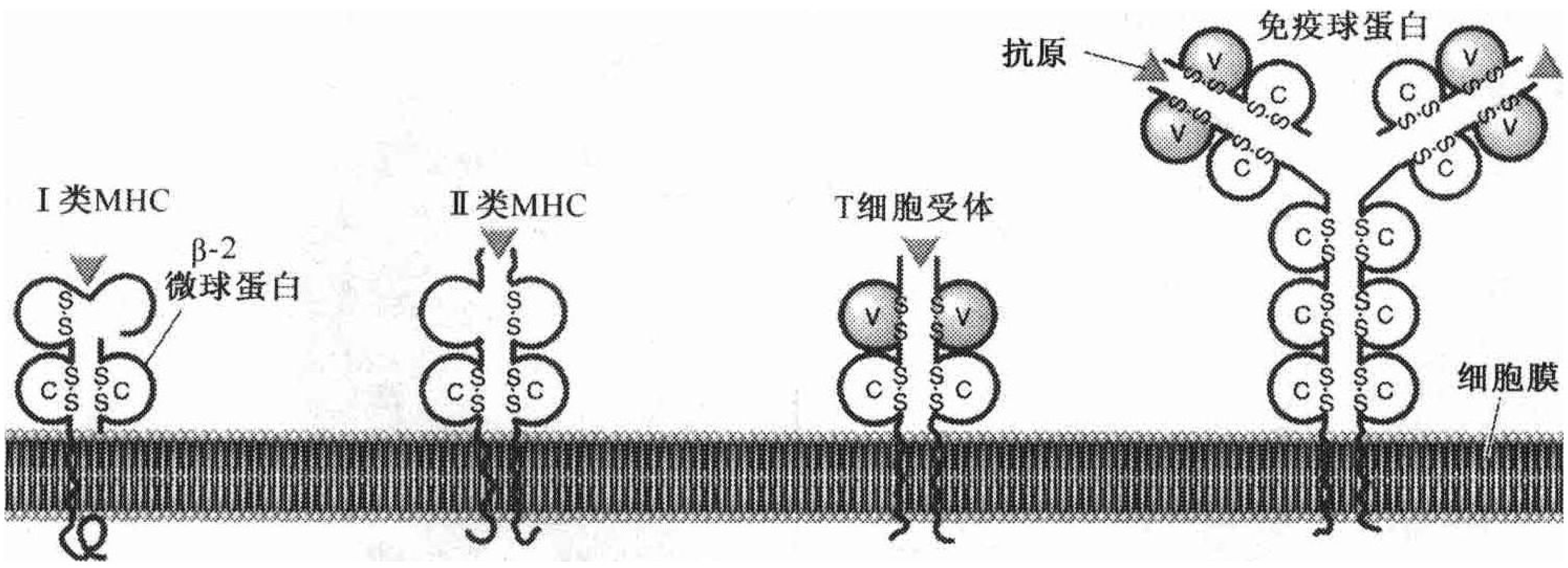


图 23.1　免疫球蛋白基因超家族蛋白。恒定区具有高同源的氨基酸序列和非常保守的结构。具有免疫球蛋白样恒定区的蛋白质与免疫球蛋白在进化上相关，均属于免疫球蛋白基因超家族。免疫球蛋白和 TCR 的可变区、Ⅰ类和Ⅱ类 MHC 蛋白的抗原结合区不具有这种保守的结构，所以它们不属于免疫球蛋白超家族。推测它们是由免疫球蛋白样结构域进化而来，但是在进化选择或某种抗原结合区具有相对较弱的结构同源性。细胞因子和补体蛋白等很多其他参与免疫应答的蛋白质，也是免疫球蛋白基因超家族的成员，但是这里列举的只是与抗原能直接作用的蛋白质。

TCR、免疫球蛋白和 MHC 蛋白的可变区（variable domain）与恒定区的大小相同，并且可变区之间、可变区与恒定区之间的结构也不同。这些蛋白质通过恒定区将可变区连接到细胞膜上，为抗原结合分子提供了完整的结构，并赋予每个蛋白质特有的形态和功能。恒定区是附属分子的靶点。例如，IgG 和 IgM 的恒定区可以结合补体（见

22.11 节），MHC Ⅰ类分子的恒定区可以结合 T_C 细胞表面的 CD8 蛋白，同源的 MHC Ⅱ类分子的恒定区可以与 T_H 细胞表面的 CD4 结合；可变区则可参与到与多种抗原的相互作用之中。

TCR、免疫球蛋白和 MHC 蛋白均由两个不同的多肽链组成，这些异型的二聚体（heterodimer）结合后形成一个功能蛋白质，在细胞表面成为抗原的受体。此外，这些分子还有其他的特殊功能。例如，免疫球蛋白作为可溶性血清蛋白被机体大量的产生，并锚定到细胞表面结合病原或其代谢物的毒素。TCR 特异性地存在于 T 淋巴细胞的表面，与 MHC 一样能与靶细胞或 APC 表面的抗原相互作用，介导 T 细胞杀伤靶细胞或产生细胞因子来激活免疫应答（见 22.7 节和 22.8 节）。

概念检查

免疫球蛋白基因超家族是指那些在进化、结构和功能上与免疫球蛋白相关的编码基因及其蛋白质，包括与抗原结合的 Ig、TCR 和 MHC 蛋白。

- 描述免疫球蛋白恒定区的结构特征。
- 为什么可变区具有与恒定区不同的结构?
- 如何区别被 TCR、免疫球蛋白和 MHC 蛋白结合的抗原?

Ⅱ 主要组织相容性复合体

主要组织相容性复合体（major histocompatibility，MHC）存在于所有脊椎动物中，MHC 蛋白参与抗原加工和呈递的过程。人类主要组织相容性复合体称为人白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）复合体，位于人的第 6 号染色体上，长度约为 4×10^6 bp（图 23.2）。

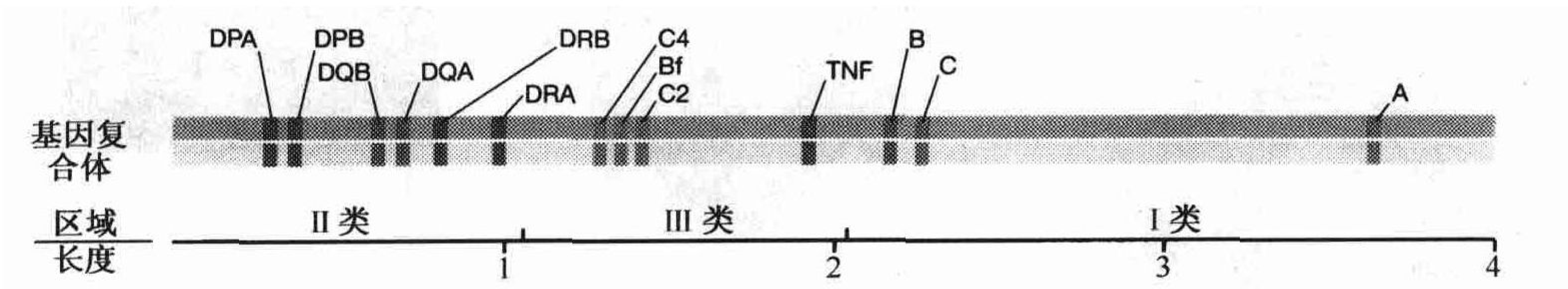


图 23.2　人主要组织相容性复合体（MHC）基因图谱。人 MHC 也称为 HLA（人白细胞抗原）复合体。HLA 复合体位于第 6 号染色体上，约有 4×10^6 bp。Ⅱ类基因 DPA 和 DPB 编码蛋白质 DPα 和 DPβ；DQA 和 DQB 编码蛋白质 DQα 和 DQβ；DRA 和 DRB 编码蛋白质 DRα 和 DRβ。Ⅲ类基因除了编码与免疫识别功能相关的蛋白质外，也编码一些不相关的蛋白质。C4 和 C2 编码补体蛋白 C4 和 C2（见 22.11 节）。TNF 基因编码肿瘤坏死因子（见 23.10 节）。MHC Ⅰ类蛋白 HLA-B、HLA-C 和 HLA-A 分别由基因 B 、C 和 A 编码。HLA 复合体上含有超过 200 种基因，其中许多参与抗原的识别、加工和呈递的过程。

23.3 MHC蛋白结构

MHC蛋白因其作为在器官移植中的主要抗原而得名，但MHC蛋白主要的生物学功能却是与肽类抗原结合，并呈递给T细胞（见22.6节）。

MHC蛋白按其结构分为两类：MHC Ⅰ类蛋白（class Ⅰ MHC protein）存在于所有有核细胞的表面，通常它将肽类抗原呈递给杀伤性T细胞（T-cytotoxic cell，T_C），如果该抗原被识别为外源性，则含有该抗原的细胞就会直接被T_C细胞摧毁（见22.7节）；MHC Ⅱ类蛋白（class Ⅱ MHC protein）主要存在于B淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞和抗原呈递细胞的表面（见22.6节），通过MHC Ⅱ类蛋白，抗原呈递细胞可以将抗原呈递给辅助性T细胞（T-helper cell），从而刺激炎症反应的发生或诱导抗体应答（见22.8节）。

MHC Ⅰ类蛋白

MHC Ⅰ类蛋白含有两条多肽链（图23.1和图23.3），一条是由6号染色体的MHC基因区编码的膜整合的α链，另一条是与之非共价结合的β-2微球蛋白（β_2m）。MHC Ⅰ类蛋白的三级结构说明了其独特的结构是如何与抗原及TCR共同作用的（图23.3）。折叠的MHC Ⅰ类蛋白由两个α螺旋和一个β折叠组成，MHC Ⅰ类蛋白的α链在α1和α2结构域之间形成一个深槽，正是这个深槽使得MHC分子能与抗原结合。这个槽的两端封闭，只能容纳8～10个氨基酸残基，该结构结合肽段后会形成一个能与TCR相互作用的肽-MHC复合物，这点将在后面具体讲解（见23.7节）。

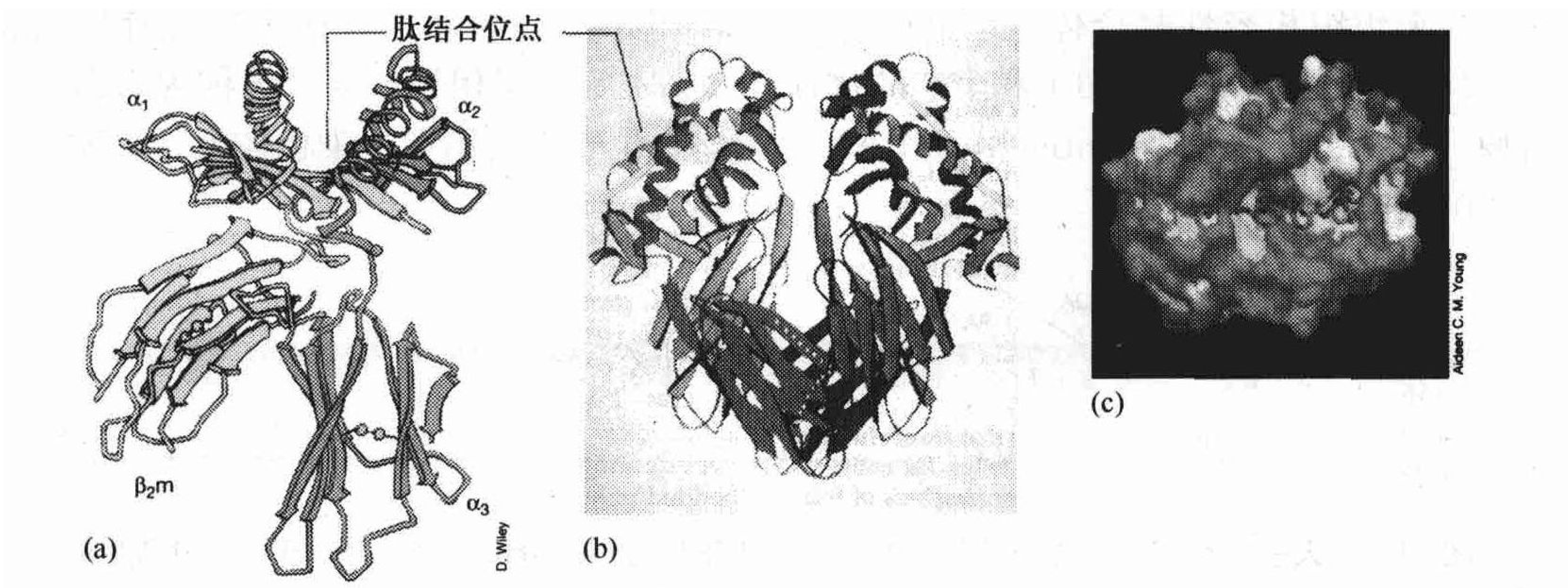


图23.3 MHC蛋白的三级结构。MHC Ⅰ类蛋白（a）与Ⅱ类蛋白（b）的二聚体形式。黄色箭头表示的肽及其在结合位点中的位置。MHC Ⅰ类蛋白与一个结合肽的空间模型（c），棒状结构代表一个9个氨基酸的肽，嵌入鼠Ⅰ类蛋白中。MHC Ⅰ类蛋白的末端封闭，能与8～10个氨基酸的肽结合。MHC Ⅱ类蛋白的末端开放，能与20个氨基酸的肽结合。

MHC Ⅱ类蛋白

MHC Ⅱ类蛋白由两条以非共价键连接的多肽链（α、β）组成（图23.1和图

23. 3)。通常Ⅱ类 MHC 蛋白分子成对地排列，保障了其与 TCR 的结合力。MHC Ⅱ类蛋白的 α1 和 β1 结构域相互作用形成一个类似于 MHC Ⅰ类的肽结合位点，但其深槽的两端是开放的，使得 MHC Ⅱ类蛋白能与超过 10 个氨基酸残基的肽段结合（图 23. 3)。与 MHC Ⅱ类蛋白结合的肽一般是在抗原呈递细胞中被加工的外源病原蛋白质的水解片段，长度为 10～20 个氨基酸或更长的肽（见 22. 6 节)。

概念检查

MHC Ⅰ类蛋白表达于所有细胞表面，可以将来自于细胞溶质的抗原性肽呈递给 T_C 细胞表面的 TCR 。MHC Ⅱ类蛋白只表达于抗原呈递细胞，它可以将外源的抗原性肽呈递给 T_H 细胞表面的 TCR。

◆ 比较 MHC Ⅰ类和Ⅱ 类蛋白的结构，说明它们相同和不同之处。

◆ 比较 MHC Ⅰ类和Ⅱ 类蛋白的肽结合位点，说明它们相同和不同之处。

23. 4 MHC 基因及其多态性

在Ⅰ类 MHC 基因中至少存在 3 种不同的基因座——HLA-A、HLA-B、HLA-C，三者都具有高度多态性。多态性（polymorphism）是指在同一基因座（染色体上基因的定位）不能用随机突变解释的复等位基因出现的频率。人的三个基因座上都有复多态性，但是对于每个个体而言，在每个基因座上只能有两个等位基因（分别来自父本和母本)，这两个等位基因共显性表达。

另外，高度多态性的基因座编码Ⅱ类蛋白 HLA-DR、HLA-DP 和 HLA-DQ。Ⅱ类 MHC 基因产物也是共显性的。所以每个个体通常展示 6 个遗传上和结构上不同的Ⅰ类 MHC 蛋白和 6 个不同的Ⅱ类 MHC 蛋白。由于供体组织的 MHC 蛋白通常会被受体免疫系统识别为外源抗原，因此 MHC 蛋白的这种多态性的变化是器官移植的主要障碍，针对供体 MHC 蛋白的免疫应答会引起细胞死亡和对供体的排斥。

虽然每个 MHC 基因只编码一个蛋白质，但 MHC 基因的多态性保证了在人体中存在着大量的可用于抗原呈递的 MHC 蛋白质。每个 MHC 的等位基因都编码含有不同氨基酸序列的蛋白质。由于 MHC 蛋白的氨基酸序列变化主要位于肽段的结合域（图 23. 3)，因此 MHC 蛋白的每个多态性的变化都能导致与不同的抗原结合。

被 MHC 蛋白结合的肽具有一个共同的结构，称为基序（motif)，每个不同的 MHC 蛋白与不同的基序结合。例如，与某种Ⅰ类 MHC 蛋白结合的所有肽的第 5 位是苯丙氨酸（Phe)、第 8 位是亮氨酸（Leu)，其氨基酸序列为 X-X-X-X-Phe-X-X-Leu（X 代表任何氨基酸)，该类肽均可能被 MHC 蛋白结合和呈递。另一个由多态性的等位基因编码的Ⅰ类 MHC 蛋白可能优先与第 4 位是缬氨酸（Val)，第 8 位是脯氨酸（Pro）的基序结合（X-X-X-Val-X-X-X-Pro)。每个基序中保守的氨基酸通常被认为是特定的残基，因为它们直接特异性地与每个 MHC 肽段结合域结合，因此只要这些肽的序列中含有特定的残基，同一 MHC 蛋白就可以结合和呈递大量不同的肽。按照这种方式计算，每个个体中存在的 6 种 MHC 蛋白就能结合和呈递大量不同的肽抗原。在Ⅱ类

MHC 蛋白和抗原呈递过程中也有类似的情况，但其他的抗原结合蛋白质，特别是免疫球蛋白和 TCR 能通过其不同的遗传机制而产生更丰富的受体多样性，因此能特异性地与更多的抗原结合（见 23.5 节和 23.7 节）。

概念检查

MHC 是编码那些能参与抗原加工和呈递蛋白质的一类基因。Ⅰ类和Ⅱ类 MHC 基因是已知的最具有多态性的基因。MHC Ⅰ类和 MHC Ⅱ类等位基因所编码的蛋白质能结合并呈递含有恒定结构基序的肽。

◆ 定义并解释 MHC 基因的多态性。

◆ 多态性的 MHC 蛋白如何将大量肽类抗原呈递给 T 细胞受体?

Ⅲ 抗体

抗体（antibody）也称免疫球蛋白，是 B 细胞表面的抗原受体蛋白，也是血清和其他体液中的可溶性蛋白质，能对抗原产生中和及调理作用（见 22.11 节和 24.6 节）。这部分将主要介绍变化多样的免疫球蛋白结构、抗原的结合功能和抗体的遗传特征。

23.5 抗体蛋白与抗原的结合

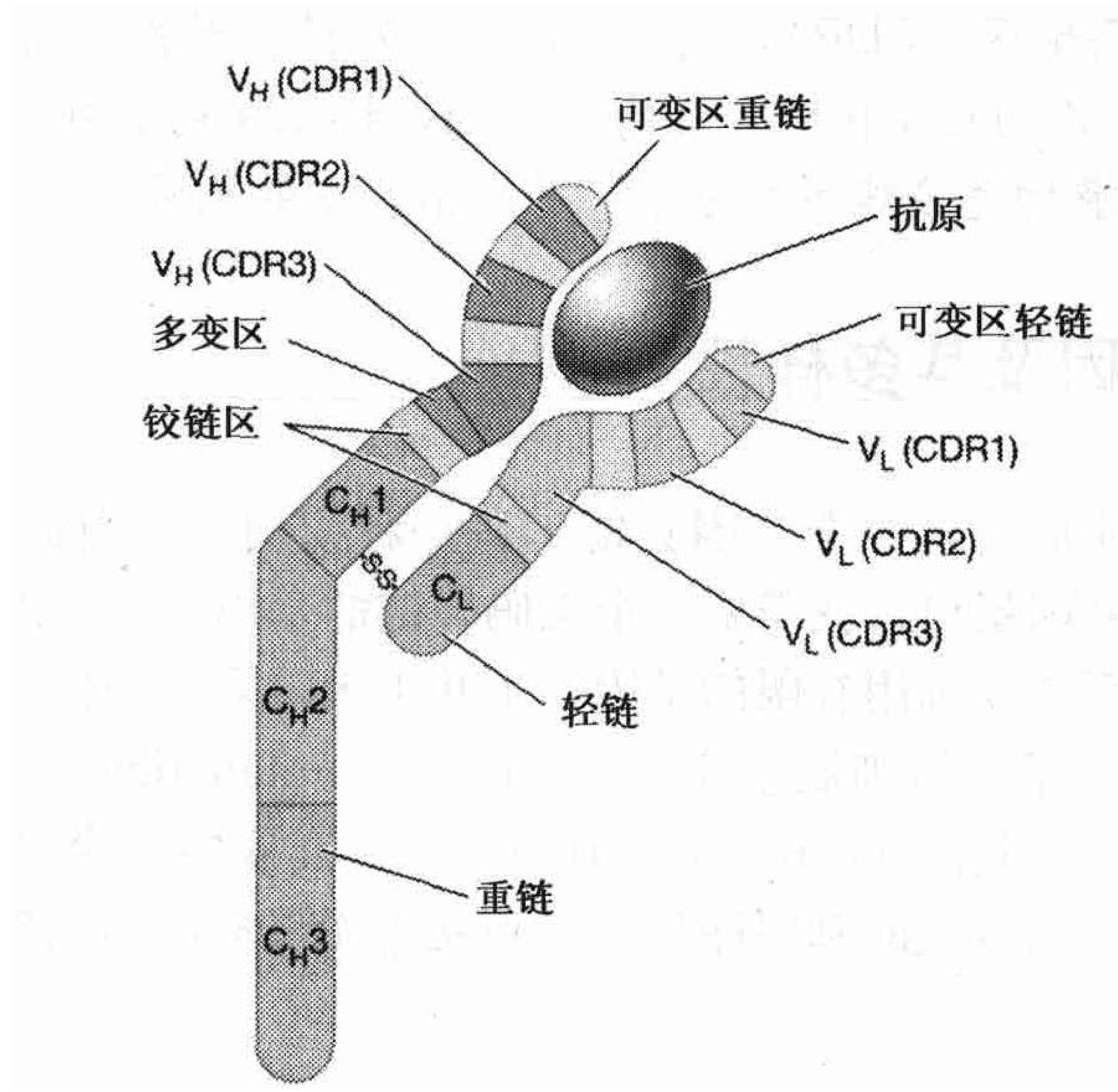
如上（见 23.1 节和第 22 章）所述，功能性的免疫球蛋白由两条重链和两条轻链组成。重链和轻链的异源二聚体构成了与抗原结合的亚单位。重链和轻链可进一步分为恒定区（C 区）和可变区（V 区），其中 C 区发挥着与补体结合等的功能，而重链和轻链的 V 区相互作用形成抗原结合位点（图 23.4）。这里将主要介绍可变区和抗原结合位点的结构与特征。

可变区

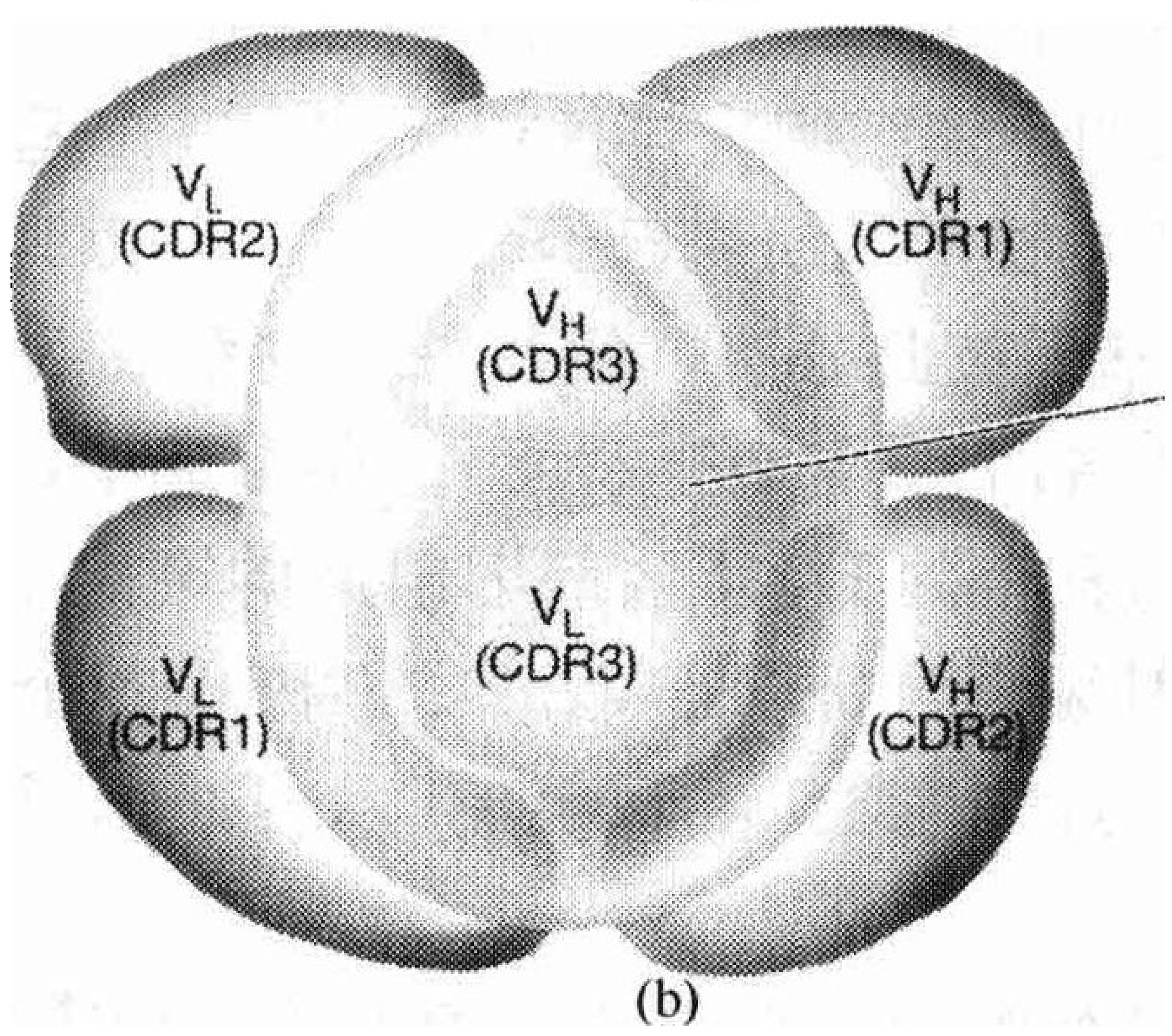
氨基酸的变异主要发生在免疫球蛋白的可变区（V 区）（图 23.4），高变区（hypervariable region）或互补决定区（complementarity-determining region，CDR）中氨基酸的变异尤其明显。CDR 提供了与抗原分子结合的特殊的结构位点，轻链和重链每个 V 区具有 3 个 CDR，所有的 CDR 均参与到与抗原的结合。不同的免疫球蛋白之间 CDR1 和 CDR2 会稍有不同，而 CDR3 却有很大的区别，其中重链的 CDR3 具有最为独特和复杂的结构。蛋白质的序列比较分析结果显示，CDR3 由 V 区的羧基端组成，后面紧跟一个约 3 个氨基酸的“多样性”（D）片段和一个 13～15 个氨基酸的“连接”（J）链；轻链的 CDR3 具有类似的排列，但缺少 D 区。

抗原结合

图 22.16 显示了免疫球蛋白的三级结构。所有抗原抗体反应的原理均依赖于抗原表



(a)



(b)

图 23.4　免疫球蛋白重链和轻链的可变区。（a）免疫球蛋白半部分的结构。C_H 和 C_L 分别指重链和轻链的恒定区，重链和轻链的互补决定区组成了一个完整的抗原结合位点。（b）红色的结合域来自于重链，蓝色的结合域来自于轻链。结合域 CDR 用数字表示，例如，L1 是指来自轻链的 CDR1。高度变化的重链和轻链的 CDR3 则位于结合位点的中心。与所有 CDR 接触的灰色部分代表抗原，这个抗原结合位点的实际结构可能是个峡谷或口袋样的结构，具体取决于相互作用的抗原和抗体。

位与抗体可变区的结合。一个抗体分子的抗原结合位点由重链和轻链联合组成，大约 2mm×3nm，该位点能与 10～15 个氨基酸的表位结合。重链和轻链的折叠方式是保障免疫球蛋白具有抗原结合功能的基础。免疫球蛋白的 V 区折叠将所有的 6 个 CDR 集中于免疫球蛋白的一端，形成一个独特的抗原结合位点（图 22.16 和图 23.4b）。接下来的部分将重点探讨产生免疫球蛋白多样性的遗传机制。

概念检查

一个免疫球蛋白的抗原结合位点由一条重链和一条轻链的 V 区组成，每个重链和

轻链都含有 3 个互补决定区（CDR），它们之间的相互折叠形成了抗原结合位点。

◆ 请描述重链的 V、D、J 区和轻链的 V，J 区对 CDR 的贡献。

◆ 请画出一个完整的免疫球蛋白分子，并指出其中的抗原结合位点。

23.6 抗体基因及其多样性

对于大多数蛋白质而言，一个基因只能编码一种蛋白质。由此推测，每一个 B 淋巴细胞每产生一种免疫球蛋白，就需要一个编码轻链的基因和一个编码重链基因。可是事实并非如此，免疫系统要利用有限的基因产生几乎无限多样的抗体，特异性地识别并结合无限变化的抗原分子。体细胞重组（somatic recombination）、重链和轻链的随机重排（random heavy and light chain reassortment）及高度的突变（hypermutation）均有利于从相对较少的固定数量的基因序列中得到几乎无限多样的免疫球蛋白。

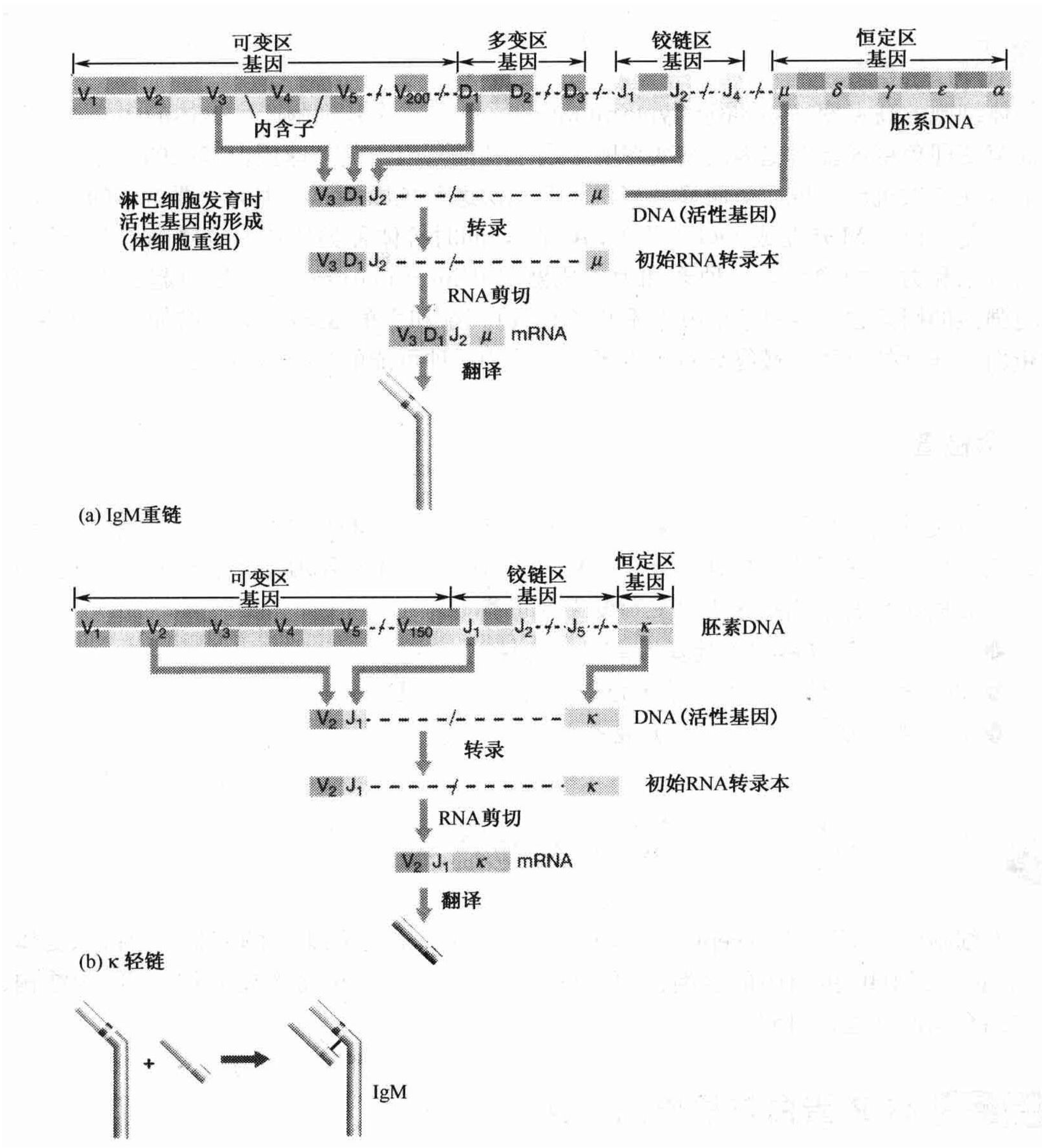
免疫球蛋白基因片段

一条轻链或重链的基因片段是在 B 细胞发育过程中经历一系列的体细胞重排（somatic rearrangement）编码而来的，体细胞重排使得大约 400 个基因片段之间进行重组从而产生大量的抗体分子。分子生物学的研究已经证实了“基因片段重排”的假设，即在基因组中 V、D、J 和 C 区的基因彼此分离，但在每个发育成熟的 B 细胞中它们便聚在一起，形成一个成熟的免疫球蛋白基因（图 23.5）。在重链中，V 区基因编码 CDR1 和 CDR2，而 V 区基因的 3′端与整个的 D、J 区基因组成的镶嵌结构编码 CDR3，免疫球蛋白分子的恒定区由 C 区基因编码。所以，V、D、J 和 C 四个不同的基因重组而形成了一个功能性的重链基因。与此相类似，轻链的 V、J 和 C 区基因重组后编码了轻链。

在发育过程中，每个 B 淋巴细胞中存在着所有免疫球蛋白需要的基因。如图 23.5 所示，每个 B 细胞大约含有 150 个衔接排列的轻链 V 区基因和 5 个独特的 J 区基因。而重链则约有 200 个衔接排列的 V 区基因、50 个 D 区基因和 4 个 J 区基因，另外还含有重链恒定区（C_H）基因和轻链恒定区（C_H）基因。V、D、J 和 C 基因之间被非编码序列（内含子）隔开（见 7.1 节和 14.8 节）。在 B 淋巴细胞成熟的过程中，每个 B 细胞均发生遗传重组。随机选择的 V、D 和 J 片段融合在一起，产生一个有活性的重链基因和一个有活性的轻链基因。活性基因（在 V、D、J 区基因片段和 C 区基因片段之间含有一个中间序列）被转录，得到的初级 RNA 转录本被剪切后形成信使 mRNA，随后 mRNA 被翻译成免疫球蛋白的重链和轻链分子。

随机配对和 VDJ（VJ）连接

免疫球蛋白的多样性是现有基因重组的结果。某个 B 细胞所最终表达的轻链和重链基因是这些重链和轻链基因随机重排和分配的结果。例如，基于 κ 轻链基因座的基因数目约有 150V×5J 种可能的随机配对，即 750 种可能的轻链序列（见 22.10 节和图 22.20），而在重链基因座中，约有 200V×50D×4J 种随机配对的可能性，即 4000 种可能的重链序列。假设每个细胞中所表达的重链和轻链的机会是均等的，那么就可能表达



(c) A和B的总数

图 23.5 人 B 细胞中免疫球蛋白基因的重排。免疫球蛋白基因在 3 个不同染色体上随机重排。(a) 第 14 号染色体上的重链基因复合物，实心部分代表免疫球蛋白编码基因，虚线部分表示中间序列（未按比例显示）。(b) 第 2 号染色体上的 κ 轻链复合物，相似的 λ 轻链基因复合物位于 22 号染色体上。(c) 半个抗体分子的组装过程。

出 750×4000，即 3×10^6 种可能的抗体（图 23.5）。

另一个抗体多样性的产生机制是 DNA 的连接机制。V-D-J 或 V-J 基因的连接是不严密的，在 VDJ（或 VJ）融合的位点通常会有几个核苷酸的突变。这种遗传上的不严密性足以产生一个或两个氨基酸的变化，从而导致产生更复杂的抗体多样性。在每个 B 细胞中，重链或轻链基因的重排只发生一次，这被称为“等位基因的排除”（allelic exclusion）的机制，从而保证了每个 B 细胞只产生一种免疫球蛋白。

高突变

体细胞的高突变（somatic hypermutation）也能导致B细胞产生抗体的多样性，所谓高突变即免疫球蛋白基因的突变率明显高于其他基因。免疫球蛋白基因的体细胞高突变通常在二次抗原免疫后更明显。当机体第二次遇到抗原后，产生的主要抗体的种类会发生变化，由IgM转变成IgG（见22.10节），同时抗体种类的转变也伴随着与抗原结合力（亲和力）的增强，这种亲和力的成熟（affinity maturation）是引起二次免疫应答更强烈的因素之一（见22.10节和图22.21）。亲和力的成熟事实上增加了产生免疫球蛋白多样性的可能，最终导致至少可以产生10^{12}种可能的免疫球蛋白。

概念检查

重组使得免疫球蛋白不同的基因片段相互混合，重链和轻链的随机配对使得遗传编码的免疫球蛋白基因的多样性最大化。V、D、J和V、J片段的不严密连接、高突变和亲和力的成熟均利于免疫球蛋白更加复杂的多样性。

- 请描述一个成熟的重链基因重组的过程。
- 描述进一步增加抗体多样性的体细胞突变的过程。
- 请说明可能产生多少种抗体结合位点。

Ⅳ T细胞受体

T细胞受体（T-cell receptor，TCR）是指位于T淋巴细胞上的细胞表面抗原受体，能识别陷入MHC蛋白中的肽类抗原（见22.6节）。在这里将主要介绍TCR的结构、抗原结合功能和遗传机制。

23.7 TCR蛋白与抗原的结合

TCR是存在于T细胞表面的膜整合蛋白，由α和β两条多肽链组成。α∶β TCR以α链和β链V区构成结合位点，实现其结合功能，特异性地与APC或靶细胞表面的MHC复合物中的外源肽段结合。同免疫球蛋白一样，TCRα链和β链的V区也含有能与抗原结合的CDR1、CDR2和CDR3区。

图23.6显示了TCR-肽-MHC蛋白复合物的三级结构。TCR和MHC蛋白均能直接与肽类抗原结合。MHC蛋白可直接与肽限制性结合，而在TCR与肽表位（epitope）的相互作用中，CDR区直接参与了MHC-肽复合物结合的过程。其中TCR α链和β链的CDR3区直接与肽表位相互作用，而CDR1和CDR2区则与MHC蛋白的α螺旋相结合。

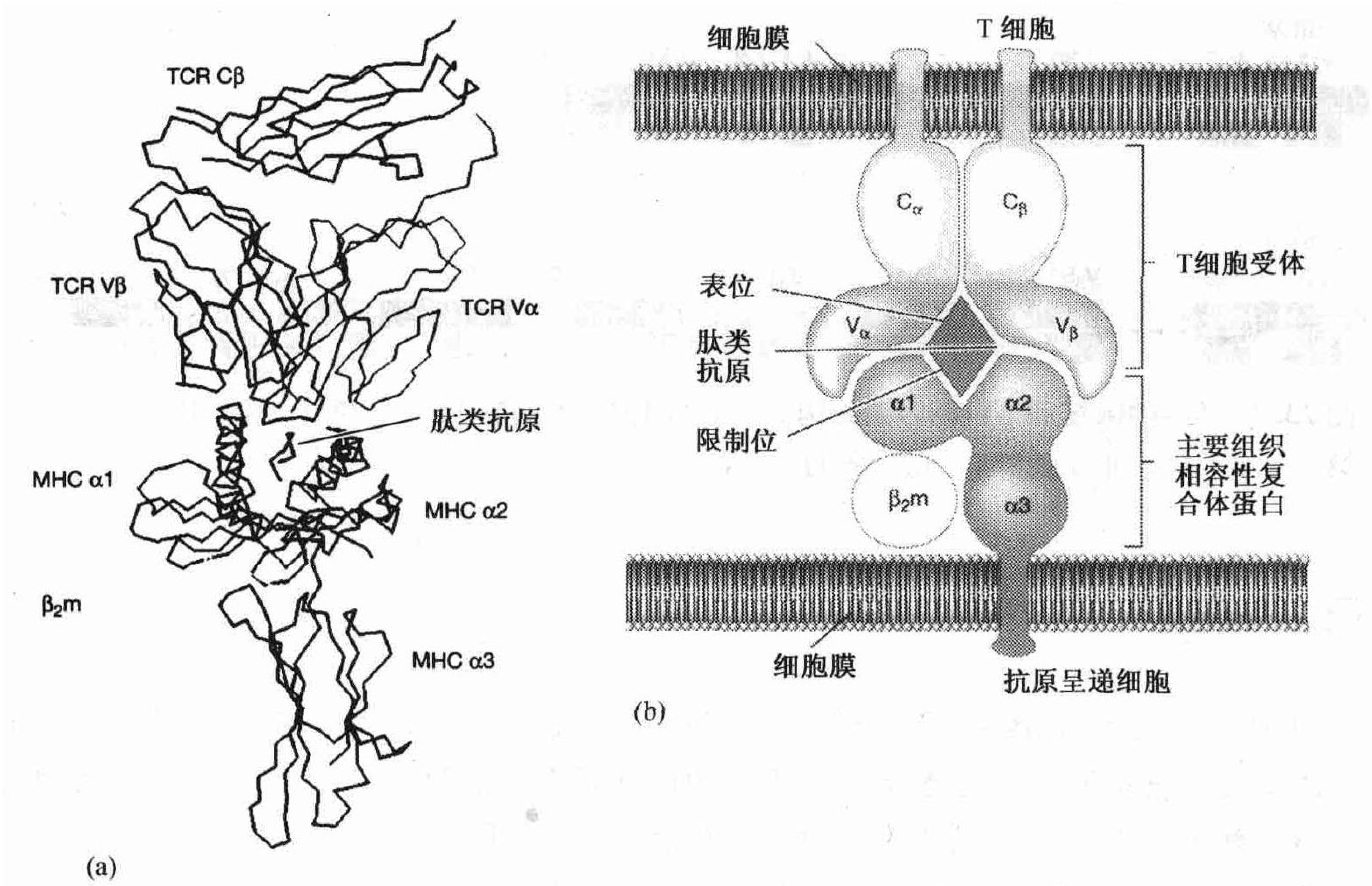


图 23.6　TCR-肽-MHC Ⅰ 蛋白复合物。(a) 三级结构显示了TCR、肽（红色）和MHC的位置，此结构来自于蛋白质数据库。(b) MHC-肽-TCR结构的图解。

概念检查

TCR是能与MHC蛋白呈递的肽类抗原相结合的蛋白质。TCR α链和β链中的CDR3区直接与肽的表位结合，而CDR1和CDR2区则与MHC蛋白结合。

◆ 请区别TCR的CDR1、CDR2和CDR3片段的功能。

◆ 请区别限制位和表位。

23.8　TCR基因及其多样性

TCR的α链和β链是由恒定区和可变区的不同基因片段编码的。与免疫球蛋白相似，TCR V区基因由许多衔接排列的基因组成，α链约有80个V区基因和61个J区片段，而β链有50个V区基因、2个D区基因和13个J区片段（图23.7）。β链的V、D、J区基因和α链的V、J区基因通过重组形成功能性的V区基因。此外，在V和D、D和J区基因片段之间可随机插入1～6个核苷酸，形成所谓的N区多样性（N-region diversity）。另外，β链的D区的3个可读框都能转录，可得到3个独立的转录本，这就比从D基因片段自身能获得更多的多样性。同免疫球蛋白重链和轻链的随机配对一样，每个T细胞随机产生单一的α链和β链，两者连接后形成完整的α∶β异源二聚体。虽然体细胞高突变机制不参与TCR多样性的过程，但TCR潜在的多样性仍然十分巨大，理论上大约能产生10^{15}个不同的TCR。

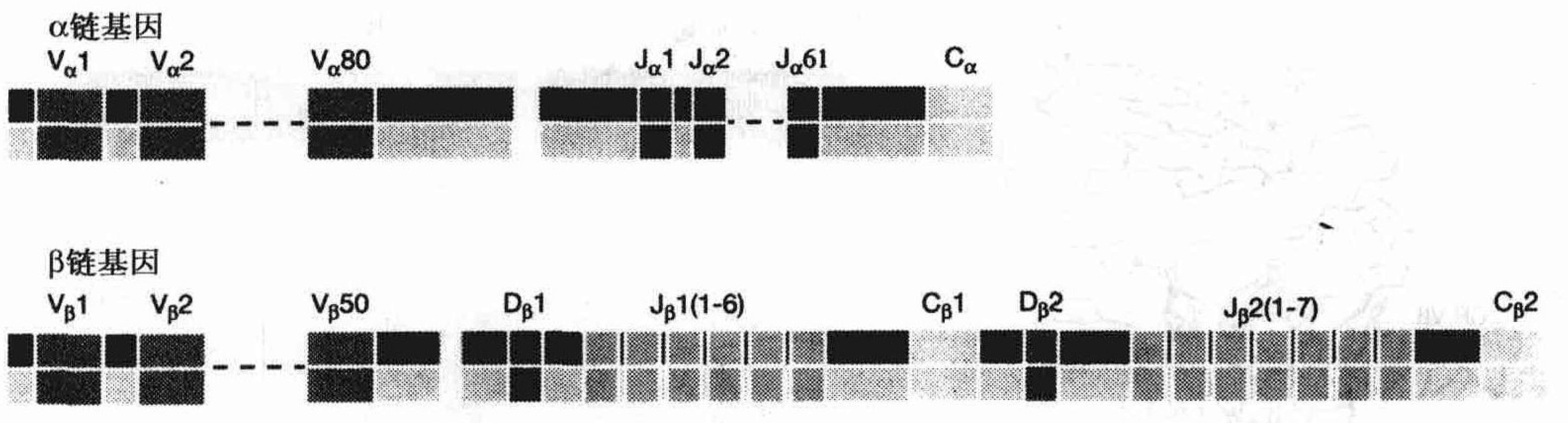


图 23.7 人 TCRα 链和 β 链基因的结构。α 链基因位于人的第 14 号染色体，β 链基因位于人的第 6 号染色体。非 α 链和非 β 链编码的 DNA 未显示。

概念检查

TCR 的 β 链的 V 区由 V、D 和 J 区基因片段编码，TCR 的 α 链的可变区基因由 V 和 J 区基因片段编码。通过重组、基因产物的随机配对、D 区 3 个可读框的转录和随机 N 端核苷酸的添加产生了更多的多样性，这保证了 TCR 可以与更多的抗原结合。

◆ 请解释 D 区 3 个读码框的转录为何有利于多样性的产生。

◆ 请解释 N 端核苷酸的添加为何有利于 TCR 多样性的产生。

V 免疫中的信号分子

免疫球蛋白和 TCR 是识别抗原的第一信号，也是活化抗原特异性 T 细胞和 B 细胞最重要的分子间作用信号。不过，其他分子信号在抗原应答前也需要被转运到淋巴细胞。这里只重点介绍活化免疫应答所需的一些其他的信号分子。首先我们介绍免疫细胞特异性结合的外源抗原，而不是与自身蛋白质相互作用的选择机制；随后我们探讨活化 T 细胞的第二信号分子；最后我们将介绍在免疫应答中相关的可溶性细胞因子（cytokine）和趋化因子（chemkine）。

23.9 克隆选择与耐受

为了产生有效的免疫应答，T 细胞必须能够区别危险的异己抗原和体内的自身抗原，所以 T 细胞必须能耐受（tolerance）或特异性地对自身抗原无应答。当机体具有这种免疫耐受能力后，免疫细胞才能选择性地只与异己抗原特异性发生作用。

克隆选择

克隆选择（clonal selection）学说认为，每个抗原反应性 B 细胞或 T 细胞均具有特异的与其相应的抗原决定簇反应的受体，当 B 细胞和 T 细胞受到抗原刺激后，便生长并分化，从而产生一群表达特异性识别某种抗原受体的细胞。最初抗原反应性细胞的这些拷贝

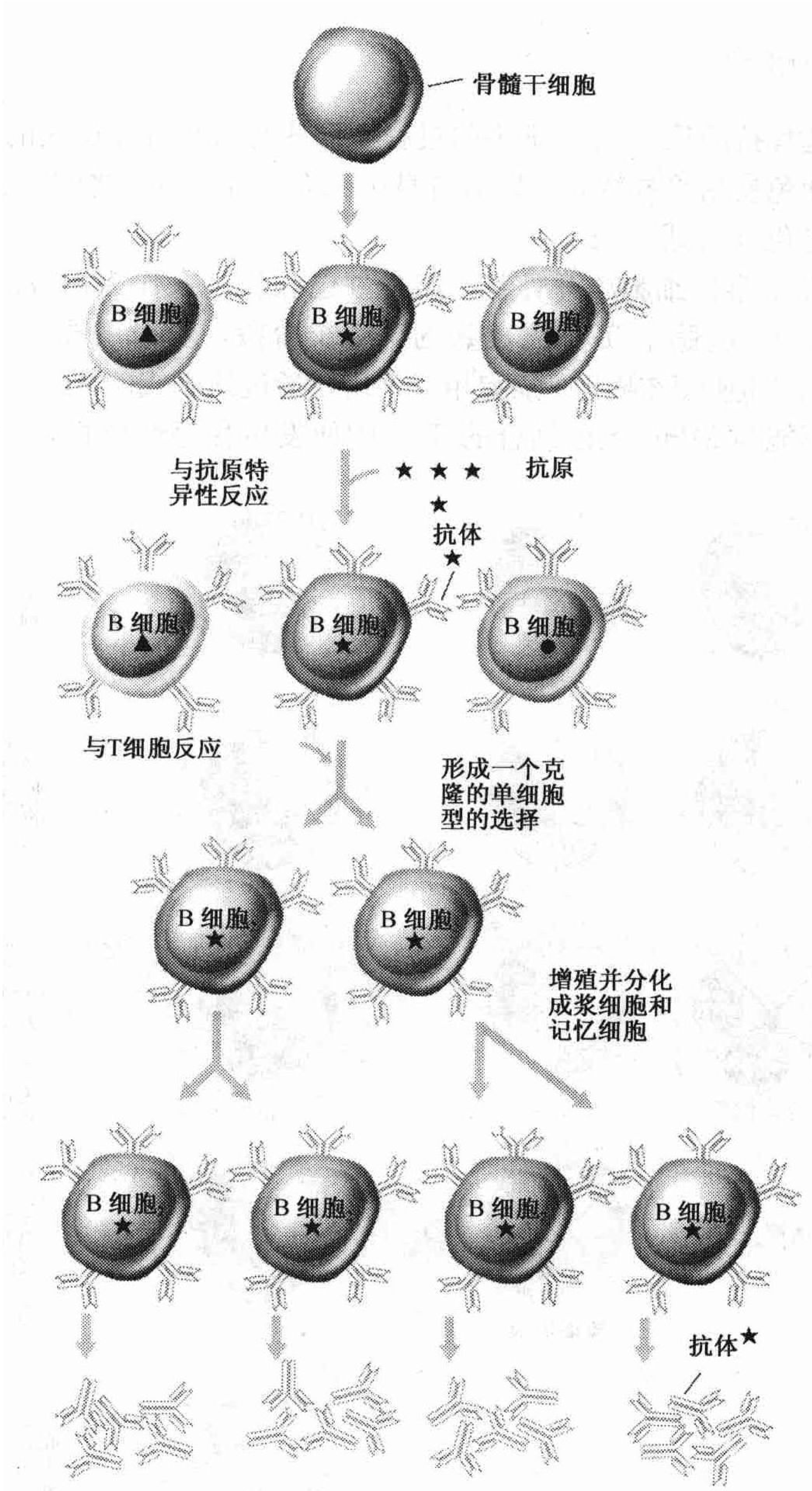


图 23.8 克隆选择。当与特异性抗原作用后，每个 B 细胞会增殖、扩增形成一个克隆。这个抗原作为选择物，推动每个抗原特异性 B 细胞的选择和增殖。抗原反应性细胞的克隆拷贝都具有一样的抗原特异性表面抗体。连续的暴露抗原导致克隆扩增的延续。相同的情况也存在于 T 细胞中。

就是克隆子（clone）（图 23.8），与此同时，那些不与抗原作用的细胞便不会生长。

为了对多种多样的抗原产生免疫应答，体内需要存在大量的抗原反应性细胞，并且这些抗原反应性细胞不能对宿主自身的抗原起免疫反应。为了满足这些特殊要求，免疫系统会选择那些对异己抗原起作用的克隆，同时清除那些自身反应性克隆。

T 细胞的选择和耐受

T 细胞经历选择抗原反应性 T 细胞的过程，那些与自身抗原反应的克隆会被清除。克隆清除的结果使免疫耐受或特异性地对自身抗原无免疫应答。之前，我们介绍了耐受障碍及并发的自身免疫（见 22.15 节）。

能成为 T 细胞的淋巴细胞离开骨髓，通过淋巴腺管进入作为初级淋巴器官的胸腺（图 23.9 和图 22.2）。胸腺中 T 细胞成熟的第一个阶段，称为正选择（positive selection)，未成熟的 T 细胞与胸腺上皮细胞相互作用，通过新生成的 TCR 结合到胸腺表面的 MHC 蛋白。不能与 MHC 蛋白结合的 T 细胞便发生程序性死亡，即凋亡（apopto-

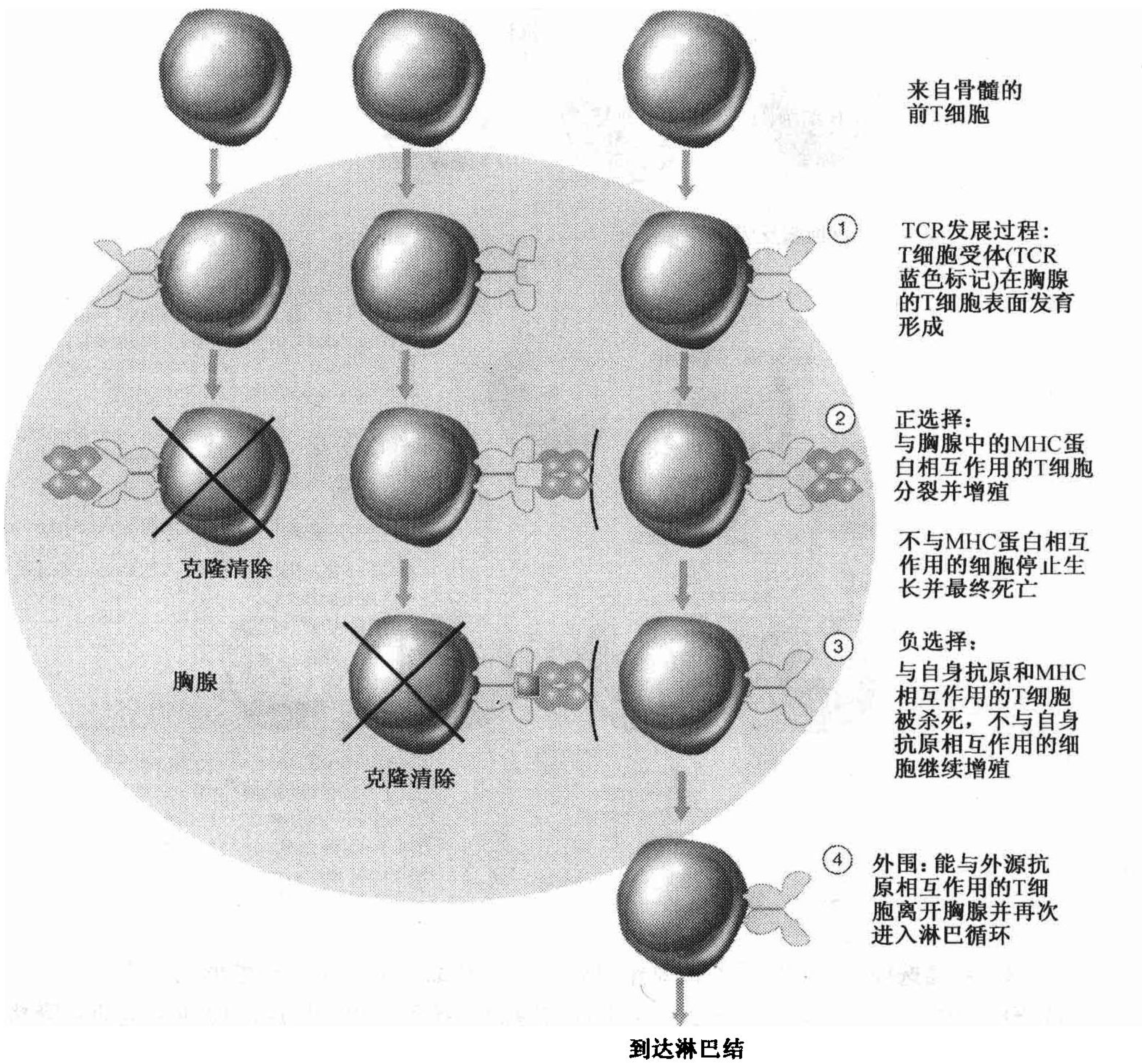


图 23.9　T 细胞的克隆选择与克隆清除。 T 细胞在胸腺中的克隆选择过程。①前 T 细胞进入胸腺，表达 TCR。②在胸腺中，T 细胞与 MHC 蛋白的结合能力受到选择。不能与 MHC 结合的细胞最终死亡，这个过程称为正选择。③有些正选择后的 T 细胞能与胸腺中的自身抗原作用，这些与自身抗原作用的 T 细胞会在胸腺中被清除，这就是负选择。④经历了正选择和负选择后存活的 T 细胞离开胸腺，其表面的 TCR 再与胸腺外的外源性抗原相互作用。

sis)；而与胸腺 MHC 蛋白结合的 T 细胞则继续生长。所以，正选择只保留了那些识别自身 MHC 蛋白的 T 细胞，而清除那些不能识别自身 MHC 蛋白的 T 细胞。

T 细胞成熟的第二个阶段是负选择（negative selection），胸腺 MHC 蛋白与抗原结合，正选择得到的 T 细胞继续与胸腺 MHC 蛋白相互作用。胸腺中的抗原大多数是自身抗原，能与胸腺自身抗原相互作用的 T 细胞具有潜在的危险性，因为它们能与自身组织抗原相作用（自身免疫），所以，这些自身反应性 T 细胞必须被清除。自身反应性 T 细胞与胸腺细胞紧密结合后最终死亡，可能因为胸腺中没有异己抗原，那些与异己抗原相互作用的 T 细胞与胸腺细胞结合得不够紧密，因此这些 T 细胞不会死亡，并且远离胸腺，转移到脾和淋巴结中，与 B 淋巴细胞和其他 APC 呈递的外来抗原相互作用。

抗原反应性 T 细胞的选择及引起耐受的两个阶段的机制被称为克隆清除（clonal deletion）。那些无用的或有害的原始的 T 细胞克隆会死亡，并且 99%以上的进入胸腺的 T 细胞会在选择过程中死亡。只有经历了正负选择后存活的 T 细胞才会离开胸腺，转移到第二级淋巴器官，随后参与针对外来抗原的免疫应答。

B 细胞耐受

自身反应性 B 细胞产生的抗体（自身抗体）可能有害于宿主器官（见 22.15 节），故此 B 细胞中的免疫耐受也是必需的。B 细胞同样要经历了克隆清除的过程。骨髓是人类 B 细胞发育的初级淋巴器官，许多自身反应性 B 细胞可在骨髓中发育时被清除（见 22.1 节）。

除了克隆清除，克隆无反应（clonal anergy）也在最终的选择中起作用，即使在骨髓中接触高浓度的自身抗原，那些自身反应性的 B 细胞也不发育。因为自身抗原虽然占据一些 B 细胞免疫球蛋白受体，但 B 细胞的活化依赖于 T 细胞作为第二活化信号（见 23.10 节），由于 T 细胞在选择中存在着清除作用，如果没有抗原反应性 T 细胞提供帮助，B 细胞就一直处于不反应状态。

概念检查

胸腺是为抗原反应性 T 细胞的成熟提供环境的初级淋巴器官。不与 MHC 蛋白作用的未成熟的 T 细胞（正选择）或与自身抗原强烈作用的未成熟 T 细胞（负选择）在胸腺中通过克隆清除而消失。那些经历了正选择和负选择后存活的 T 细胞离开胸腺后参与了有效的免疫应答。那些对自身抗原有反应性的 B 细胞通过克隆清除、选择和无能而被控制。

- 人类有哪些耐受的自身蛋白质和不耐受的蛋白质？请各举一例。
- 区别 T 细胞选择中的正选择和负选择。
- 区别 B 细胞的克隆清除和克隆无能。

23.10 第二信号

如上所述，在胸腺中 T 细胞对异己抗原克隆选择的过程也是对自身抗原耐受或无

反应性选择的过程，那些与自身抗原有相互作用的 T 细胞在胸腺中被清除。同时，有许多自身抗原在胸腺中并不表达，而与这些非胸腺抗原应答的 T 细胞能逃避克隆清除，但是在次级淋巴器官中可能通过克隆无能的过程使这些对自身抗原应答的 T 细胞处于克隆不应答状态。类似于 B 细胞，导致 T 细胞克隆不应答状态的关键是 T 细胞活化中的双信号机制。

T 细胞活化和第二信号

经克隆选择成熟的 T 细胞离开胸腺后，移居到次级淋巴器官（淋巴结、脾和黏膜相关性淋巴器官或 MALT)。这些 T 细胞未同抗原接触，被称为天然或自由的 T 细胞，这些 T 细胞必须被 APC 活化才能成为效应细胞（见 22.6 节)。

这些天然的 T 细胞被激活的第一步就是通过 TCR 与 APC 表面的肽-MHC 蛋白复合物结合（图 23.10)，这是活化所必需的第一信号，没有第一信号 T 细胞就不能被活化。

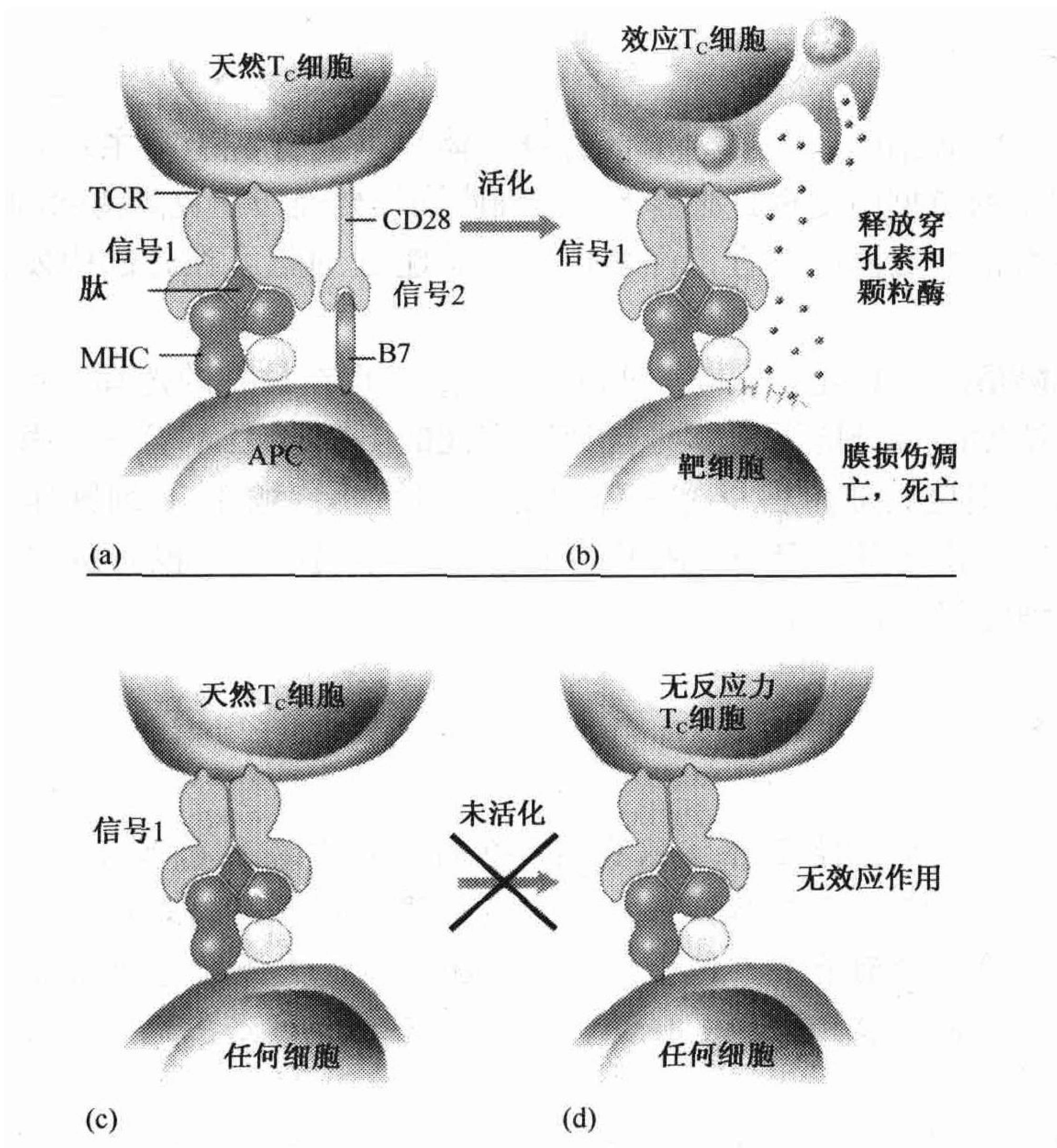


图 23.10 活化的天然 T 细胞所需的第一信号和第二信号。(a) 一个天然的 T_C 细胞通过 TCR 与 APC 表面的肽-MHC 复合物作用，产生第一信号。T_C 细胞具有 CD28 蛋白，能与 APC 表面的 B7 蛋白作用，产生第二信号。T_C 细胞和 APC 细胞通过第一信号和第二信号的协同作用活化天然的 T 细胞。(b) 只要产生第一信号，被永久激活的 T_C 细胞就能杀死任何靶细胞。(c) 天然 T_C 细胞通过 TCR 与人和细胞表面的肽-MHC 复合物相互作用。尽管满足了第一信号的条件（通过 TCR 与肽-MHC 复合物相互作用)，但由于只有 APC 才具有 B7 蛋白，因此不能产生第二信号。(d) 缺少第二信号，T_C 细胞将永久处于不应答状态。

T 细胞被活化的下一步包括另外两个蛋白质的相互作用，一个是在 APC 表面被称为 B7 的蛋白，另一个是在 T 细胞表面的 CD28 蛋白。B7 与 CD28 的结合和相互作用是激活 T 细胞的第二信号。缺少第二信号，T 细胞也不能被激活（图 23.11）。被激活的 T 细胞将成为效应细胞，只需第一信号（肽-MHC）就能引发效应反应（图 23.10），如 T_C 细胞被激活后会杀伤带有抗原的靶细胞，甚至还能杀伤那些不带有 CD28 的靶细胞。

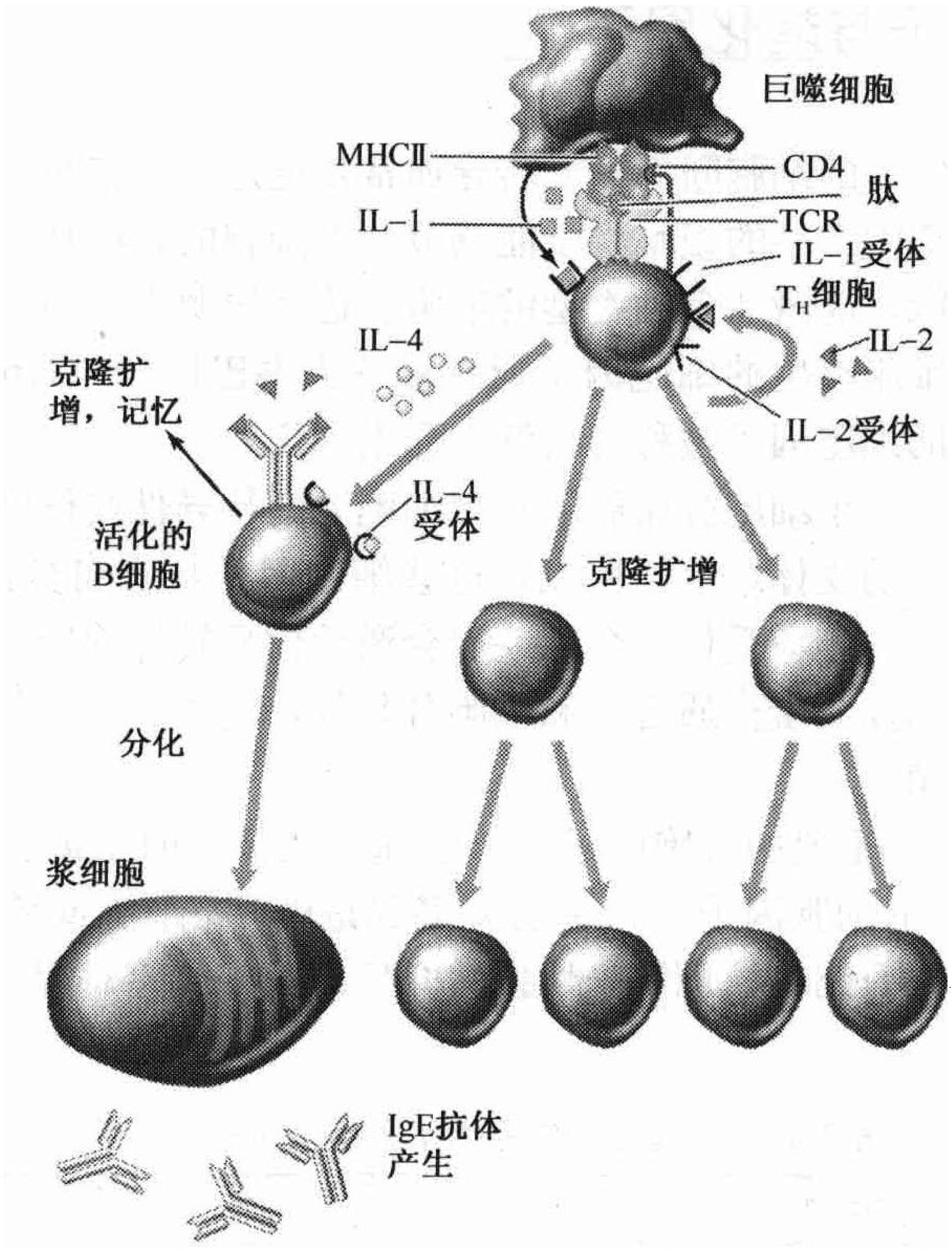


图 23.11　细胞因子和抗体的产生。细胞因子 IL-1、IL-2 和 IL-4 在抗体应答中的主要效应和相互作用。细胞因子能为吞噬细胞、T 细胞和 B 细胞提供信号。细胞因子能通过刺激吞噬细胞增强抗原的摄取，同时也能刺激 T 细胞和 B 细胞的活化、分化和增殖。

第二信号主要用来建立和维持克隆不应答状态。例如，一个与非 APC 上的自身抗原相互作用的天然 T_C 细胞只能接受第一信号，因为非 APC 不能展示第二信号中所需要的 B7 蛋白。在没有第二信号情况下，T_C 是没有反应能力的，不能被激活（图 23.10），所以，第二信号 B7：CD28 是活化所必需的。没有第二信号只有第一信号会引发持久的不应答状态。天然的 T_H1 和 T_H2 淋巴细胞也是以同样的方式被激活，均是通过 B7：CD28 来提供第二信号。

概念检查

许多自身反应性 T 细胞在胸腺中经过发育和成熟的过程被清除。天然的 T 细胞在次级淋巴器官中，首先通过 TCR 与肽：MHC 蛋白结合而被激活（第一信号），随后

APC 的 B7 蛋白与 T 细胞的 CD28 蛋白结合产生第二信号。在次级淋巴器官中，如果没有第二信号只有第一信号，天然的自身反应性 T 细胞将处于不应答状态。

◆ 请定义天然的 T 细胞中的第一信号和第二信号。

◆ 请指出诱导 T 细胞活化并产生效应功能所需要的信号分子。

23.11 细胞因子与趋化因子

免疫系统活化所必需的细胞间的信号转导通常是通过一类被称为细胞因子的可溶性蛋白质来实现的。白细胞产生的细胞因子能调节免疫细胞的多种功能，并且一种细胞因子具有广泛的生理功能，能激活多种类型的细胞。这些异源蛋白质的共同点是它们都是由白细胞产生。淋巴细胞产生的细胞因子通常被称为淋巴因子（lymphokine）。能介导白细胞间的相互作用的细胞因子被称为白细胞介素（IL）。

通常，细胞因子被一个细胞分泌后能与靶细胞上的特异性受体结合，而有些细胞因子能与自身分泌细胞上的受体结合，所以，这些细胞因子具有自分泌（autocrine）（自刺激）活性。细胞因子与相应受体结合后一般会激活信号转导途径（见 8.12 节），传递细胞膜间的信息，从而控制蛋白质合成和细胞分裂等，这些信号的最终将导致细胞的生长、分化和克隆的增殖。

表 23.2 列出了一些重要的细胞因子、产生细胞及常见的靶细胞和它们的生物学功能，共有近 40 种已知的细胞因子，其中的大多数是由 T_H 细胞或单核细胞和吞噬细胞产生的。这里我们重点介绍在抗原特异性抗体介导的免疫应答过程中三种主要的细胞因子的作用。

表 23.2 一些主要细胞因子和趋化因子的性质

细胞因子	产生细胞	主要靶点	效应
IL-1[a]	单核细胞	T_H	活化作用
IL-2	活化的 T 细胞	T 细胞	生长，分化
IL-3	T_H1	造血干细胞	生长因子
IL-4	T_H2	B 细胞	IgG1 和 IgE 合成
IL-5	T_H2	B 细胞	IgA 合成
IL-10	T_H2	T_H1	抑制 T_H1
IL-12	吞噬细胞，树突状细胞	T_H1，NK 细胞	分化，激活作用
IFN-α[b]	白细胞	正常细胞	抗病毒
IFN-γ	T_H1	巨噬细胞	活化作用
GM-CSF[c]	T_H1	骨髓干细胞	分化成粒细胞，单核细胞
TGF-β[d]	T_H1 和 T_H2	吞噬细胞	抑制活化作用
TNF-α[e]	T_H1，巨噬细胞，NK 细胞	吞噬细胞	活化作用
TNF-β	T_H1	吞噬细胞	活化作用
趋化因子			
IL-8	吞噬细胞，成纤维细胞角化细胞	嗜中性粒细胞，T 细胞	趋化和活化作用
MCP-1[f]	吞噬细胞，成纤维细胞角化细胞	巨噬细胞，T 细胞	趋化和活化作用

a. IL，白细胞介素；b. IFN，干扰素；c. GM-CSF，粒细胞和单核细胞集落刺激因子；d. TGF，T 细胞生长因子；e. TNF，肿瘤坏死因子；f. MCP，吞噬细胞趋化蛋白质。

IL-1、IL-2 和 IL-4

众所周知，巨噬细胞负责抗原的摄取、加工和呈递（见 22.16 节），它们能分泌作用于不同细胞类型的细胞因子 IL-1（表 23.2 和图 23.11）。IL-1 是免疫应答中的关键物质，T_H 细胞可以被 IL-1 活化。在 T_H 细胞和淋巴结中的巨噬细胞相互接触过程中，与 T_H2 细胞表面 IL-1R 结合的 IL-1 作为激活信号使 T_H2 细胞活化。被激活的 T_H2 细胞可以应答产生 IL-2，分泌的 IL-2 再与 T_H2 细胞表面的 IL-2R 结合，从而激活那些分泌它的细胞。在 IL-2 的作用下，细胞将进行分裂和克隆复制。在这个过程中，T_H 细胞也产生其他细胞因子，如能与 B 细胞表面的 IL-4R 结合的 IL-4。IL-4:IL-4R 复合物能刺激 B 细胞分化，产生能够分泌抗体的浆细胞（见 22.10 节）。综上所述，IL-1、IL-2 和 IL-4 是抗体介导的免疫应答中巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞的可溶性的调节因子和激活剂。

其他细胞因子

表 23.2 描述了一些细胞因子的功能，其中的许多蛋白质能特异性地影响免疫细胞，例如，IL-4 主要影响 B 细胞。可是也有一些细胞因子不影响 T 细胞或 B 细胞，但是对其他细胞起作用。被细胞因子激活的细胞可产生作为天然宿主应答中重要的调节因子。例如，白细胞产生的干扰素（IFN-α 和 IFN-γ）能抑制体内病毒的复制；TNF-α 是炎症反应重要的激活剂，当分泌 TNF 的细胞接近肿瘤时，肿瘤坏死因子 TNF-α 和 TNF-β 能杀死多种肿瘤细胞（见 22.3 节）。干扰素和肿瘤坏死因子看似没有靶细胞特异性，但 T 细胞和吞噬细胞产生的干扰素和肿瘤坏死因子能增强免疫细胞的作用。

趋化因子

趋化因子是一类小分子蛋白质，能作为吞噬细胞和 T 细胞的化学引诱剂。它们由淋巴细胞和其他多种细胞产生，能应答于细菌、病毒和其他对宿主细胞有害的物质。趋化因子能引诱巨噬细胞和 T 细胞到达受伤部位，并刺激炎症反应，加强特异性的免疫应答。

已知的趋化因子约有 40 个，目前研究最清楚的是 IL-8 和巨噬细胞趋化因子蛋白-1（macrophage chemoattractant protein-1，MCP-1）（表 23.2）。由于组织损伤或病原体的侵入，许多种细胞都能产生 IL-8，如单核细胞、吞噬细胞、纤维原细胞（结缔组织细胞）和角化细胞（皮细胞）。IL-8 从受侵袭的细胞中分泌，随后与周围的组织结合作为 T 细胞和嗜中性粒细胞的化学引诱剂（见 22.1 节），引起中性粒细胞介导的炎症反应，并引起 T 细胞介导的特异性免疫应答。同细胞因子受体一样，靶细胞上的趋化因子受体也是通过信号转导途径发挥作用，诱导靶细胞或 T 细胞活化。

有多种细胞能产生 MCP-1，可以引起巨噬细胞和 T 细胞的聚集，并刺激炎症调节因子的产生，活化抗原特异性的免疫应答。所以，趋化因子是引起 T 细胞聚集和抗原特异性免疫反应的诱因。

概念检查

细胞因子是由白细胞产生的可溶性调节蛋白质，能调节细胞间的相互作用。有些细胞因子，如 IL-1、IL-2 和 IL-4 能作用于白细胞，是产生特异性免疫应答的关键物质。其他的细胞因子如 IFN 和 TNF，能对多种类型的细胞起作用。趋化因子是由多种细胞应答于外源性损伤而产生的，是非特异性炎症细胞和 T 细胞潜在的引诱剂。

◆ 请比较 IL-1、IL-4、IL-12、IFN-γ 和 TNF-B 的靶细胞。

◆ 细胞因子和趋化因子的细胞来源有何不同？它们的靶细胞有何不同？

◆ 什么因素能刺激细胞因子的产生？什么因素能诱发趋化因子的产生？

复习题

1. 请说明模式识别分子（PRM）和与之相互作用的病原相关的分子模式（PAMP）。（见 23.1 节）
2. 请说明免疫球蛋白基因超家族的基因及其蛋白质的定义。（见 23.2 节）
3. 请说明Ⅰ类和Ⅱ类 MHC 蛋白的主要结构特征。（见 23.3 节）
4. 多态性是指不同的 MHC 蛋白能结合具有不同基序的肽。对于Ⅰ类 HLA 的多态性而言，每个个体能表达多少种不同的 HLA 蛋白？整个人类又会有多少种？（见 23.4 节）
5. 构建一个完整的抗体结合位点需要有哪些免疫球蛋白的肽链参与？其结构域和 CDR 又如何？（见 23.5 节）
6. 从免疫球蛋白基因构建的 V_H 和 V_L 结构域的总数出发，计算所有可能的重链和轻链随机配对后，会产生多少完整的免疫球蛋白分子？（见 23.6 节）
7. 请描述 TCR 与肽抗原和 MHC 蛋白的相互作用关系，说明 TCR 中 CDR 的关键作用。（见 23.7 节）
8. 基因重组和随机配对能导致 TCR 产生多样性，N 端核苷酸的添加和 D 片段三个可读框的转录也同样能增加和丰富其多样性。试解释这些机制是如何发挥作用的。（见 23.8 节）
9. 请解释说明 T 细胞的正选择和负选择。（见 23.9 节）
10. 天然 T 细胞活化中需要哪些分子间的相互作用？效应细胞的活化中又需要哪些分子间的相互作用？（见 23.10 节）
11. 细胞因子和趋化因子的主要作用是什么？细胞因子和趋化因子的主要区别又是什么？（见 23.11 节）

应用题

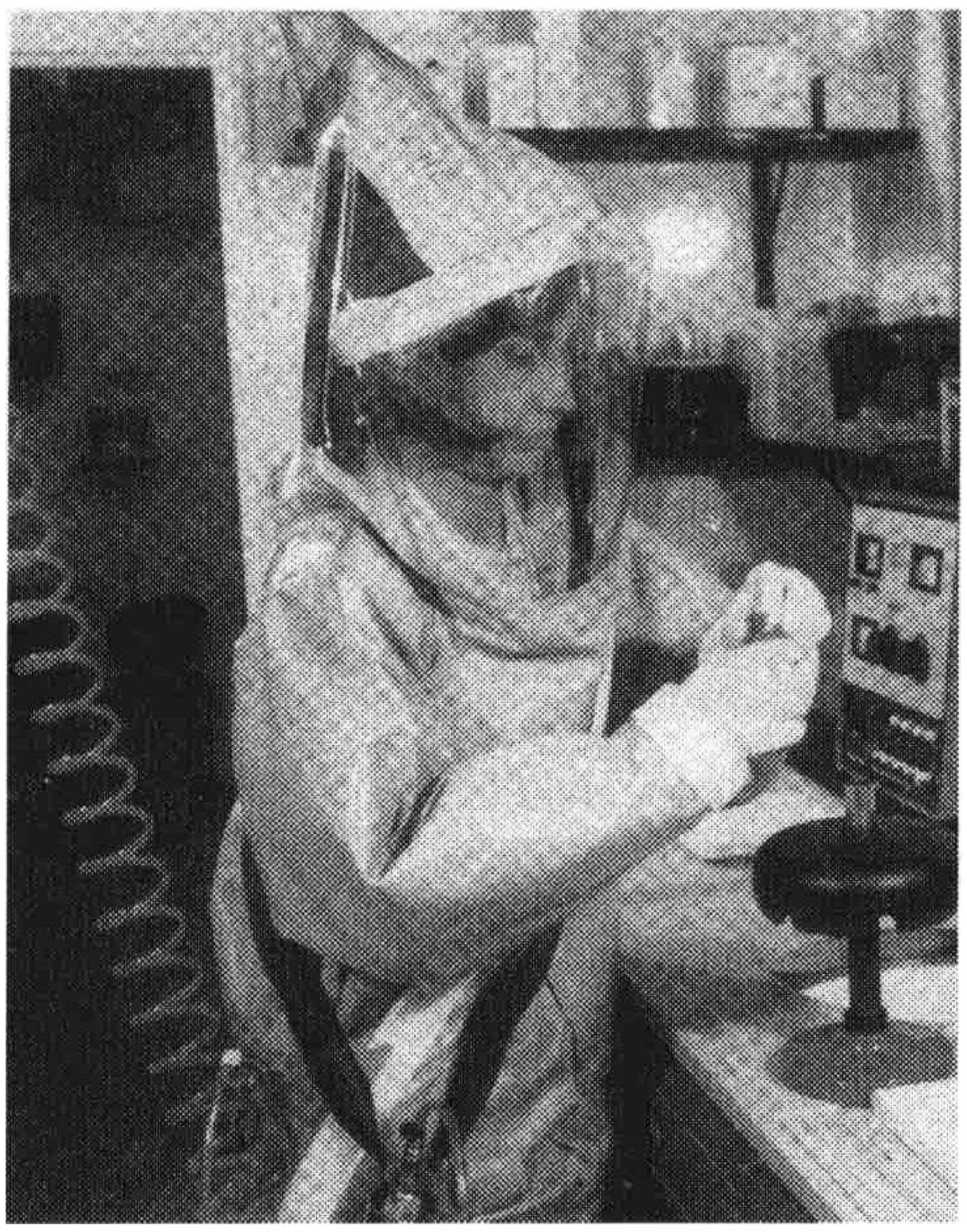
1. 通过预测宿主，说明清除每一个 PRM 的遗传突变的结果。

2. 请例举免疫球蛋白基因超家族成员编码的蛋白质的共同特征。对于免疫球蛋白、TCR 和 MHC 蛋白而言，请说明适合这些蛋白质共同结构的特征。
3. 多态性指不同的 MHC 蛋白所结合的肽的基序不同，可是，对于Ⅰ类蛋白，每个个体只能识别 6 个肽基序，而整个人类能识别的基序超过 350 个，这对于人类有什么好处？对于每个个体又有什么好处？
4. 虽然遗传重组对产生免疫球蛋白抗原结合位点的多样性很重要，但转录后体细胞的突变可能对获得免疫球蛋白的多样性更为重要，你同意这个观点吗？请解释其原因。
5. 如果没有正选择，T 细胞库会产生怎样的结果？如果没有负选择呢？
6. 与抗原相互作用的所有的外周 T 细胞被活化的结果是什么？第二信号是如何防止其发生的？

（白 钢 译，张心平 校）

24

诊断微生物学和免疫学



必须预防实验室诊断人员被感染。图示工作人员在最高生物安全防护等级为4级（BSL-4）的装置中操作对人致命的病原体。

词汇表

凝集反应（agglutination）：抗体和颗粒性抗原之间形成肉眼可见的凝集物的反应
抗菌谱（antibiogram）：表明临床分离到的微生物对常用抗生素敏感性的报告
菌血症（bacteremia）：血液中有细菌存在
鉴别培养基（differential media）：能根据表型特征鉴定微生物的培养基
ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）：酶联免疫吸附测定
滋养培养基（enriched media）：添加了特殊生长因子用来培养有特殊代谢需求微生物的培养基
富集培养（enrichment culture）：在特定的培养条件下用特定培养基从自然样品中分离微生物
荧光抗体（fluorescent antibody）：抗体分子用荧光染料共价修饰，此染料使抗体分子在荧光下可见
通用培养基（general purpose media）：能够培养大多数好氧和兼性厌氧微生物的培养基
免疫印迹（Western 杂交）[immunoblot（Western blot）]：蛋白质经过电泳后转移到膜上并通过特异抗体在膜上检测
单克隆抗体（monoclonal antibody）：从单一 B 细胞克隆制备的抗体
中和作用（neutralization）：抗体和抗原反应后使抗原的生物活性降低和消失
核酸探针（nucleic acid probe）：作为杂交探针识别特定基因的特异核苷酸序列
多克隆抗体（polyclonal antibodies）：从不同 B 细胞克隆制备的抗体
沉淀反应（precipitation）：抗体和可溶性抗原之间反应形成可见的不溶物
RIA（radioimmunoassay）：放射免疫试验
选择培养基（selective media）：添加了特定成分的培养基，该培养基可以促进某一种微生物的生长而抑制其他微生物的生长
敏感度（sensitivity）：抗体能被检测到的最低浓度
败血症（septicemia）：血液感染
血清学（serology）：研究抗原-抗体体外反应的学科
特异性（specificity）：抗体识别某种抗原的能力
效价（titer）：免疫学试验中，溶液中存在抗体的数量

微生物学在鉴定引起感染性疾病的因子方面发挥着重要的作用，微生物学的这个领域叫做诊断或临床微生物学（diagnostic or clinical microbiology）。临床实验室通常能在取样后的 48h 内培养、分离和鉴定出大多数普通病原细菌。免疫和分子生物学的诊断方法甚至可以不通过培养鉴定大多数病原体，这些诊断方法对于诊断病毒和原虫的感染尤为重要，因为这些病原体的培养难度使得鉴定它们成为一种挑战。

Ⅰ 生长依赖性诊断方法

我们首先讨论从宿主组织中分离和培养病原体的原理。生长依赖性方法在鉴定大多数病原体中是非常重要的。

24.1 临床样品中病原体的分离

在患者的临床治疗中，医生可能会怀疑是否是传染性疾病。于是收集一些被感染组

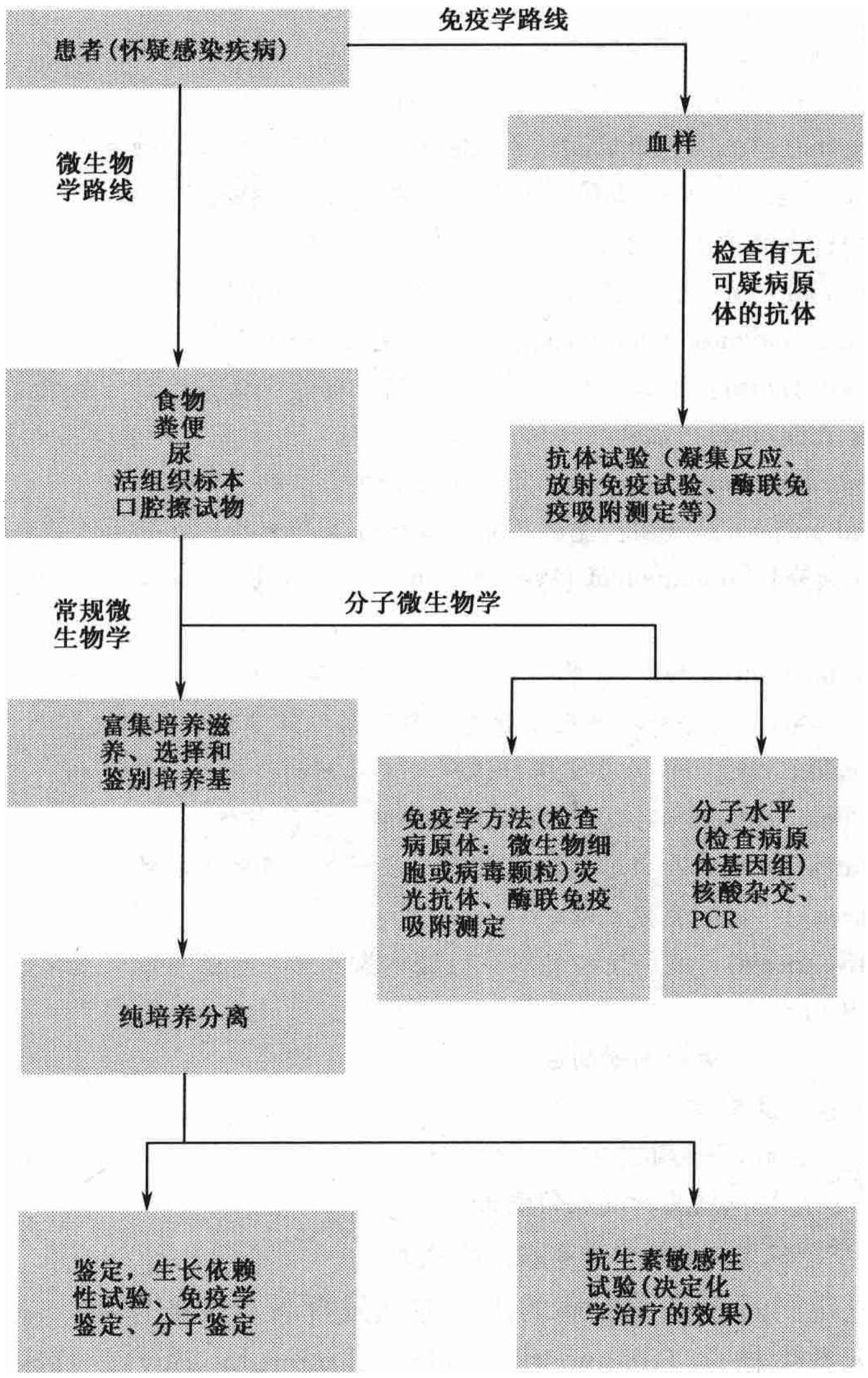
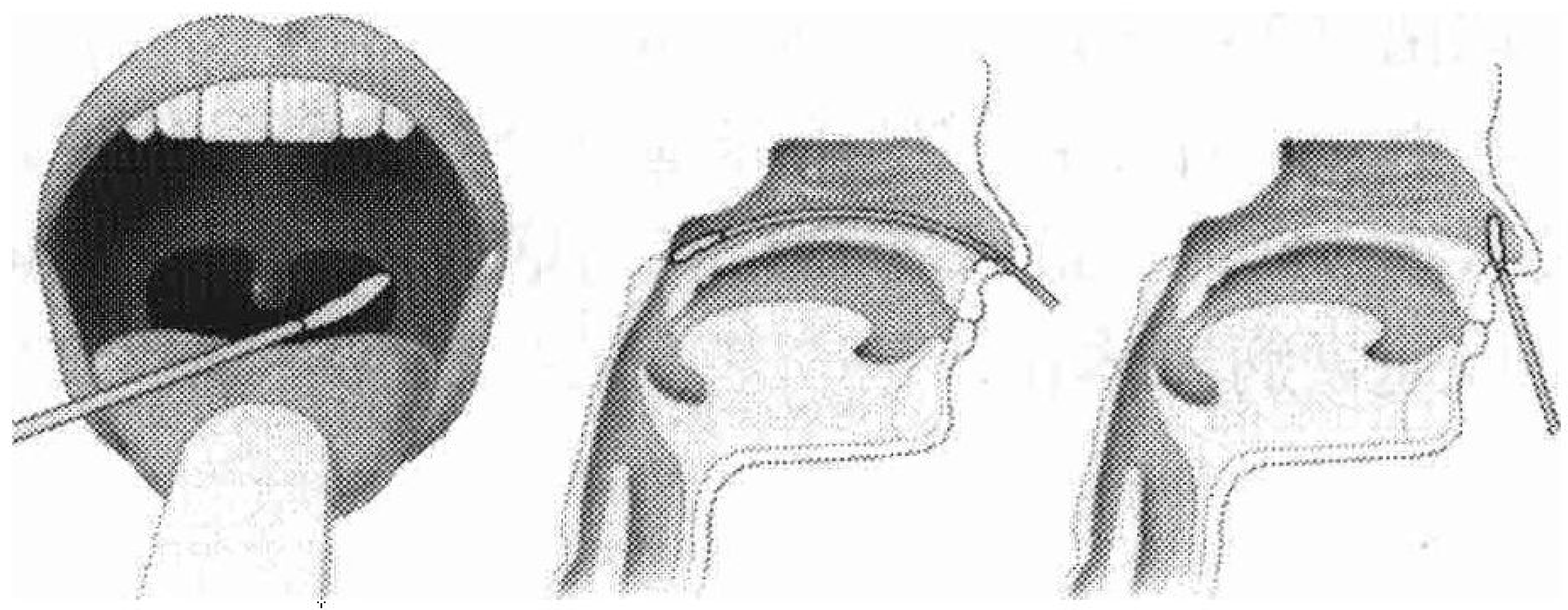


图 24.1　分离和鉴定病原体。用于分离和鉴定感染病原体的临床诊断方法。

织或体液的样品，用于微生物学、免疫学和分子生物学方面的分析（图 24.1)。这些收集的材料可能是血液、尿液、粪便、唾液、脑髓液或者伤口上的脓液。用一支无菌的棉球从被感染的部位取样即可（图 24.2)。然后用棉球在琼脂培养基表面或盛有液体培养基的试管中接种；有时，可取小片存活组织无菌培养。表 24.1 总结了从典型的临床样品中分离生物体常用的培养方法。



(a) (b) (c)

图 24.2 从上呼吸道获得样品的方法。(a) 喉咙棉拭。(b) 鼻咽棉拭。(c) 鼻腔棉拭。

表 24.1 病原体初步分离用推荐基础和选择培养基

标本	培养基[a]				
	血琼脂	肠道琼脂	CA	MTM	ANA
液体：胸、腹、心包、关节	+	+	+	−	+
排泄物：直肠或肠内流出物棉拭[b]	+	+	+	−	−
外科活组织样本	+	+	−	−	+
咽喉、痰、扁桃腺、鼻咽、肺、淋巴结	+	+	+	−	−
尿道、阴道、宫颈	+	+	+	+	−
尿	+	+	−	−	−
血[c]	+	−	−	−	+
伤口、脓肿、渗出液	+	+	+	−	+

资料来源：Murry P R，Baron E J，Jorgenson J H. 2003. American Society for Microbidogy，Washington，D C.。

a. 血琼脂，5%的绵羊全血加到胰蛋白酶大豆汁琼脂中；肠道琼脂，伊红美蓝琼脂或麦康基氏琼脂；CA，巧克力琼脂（加热过的血）；MTM，改良马氏琼脂；ANA 厌氧琼脂，含有巯基乙酸盐的血琼脂或补充巯基乙酸盐的琼脂，于厌氧条件下培养。

b. 特殊肠道病原体培养基，SMAC（含有山梨醇的麦康基氏琼脂），也可以用于培养粪便和肠道样品。SMAC 是选择、鉴别培养基，用于分离、鉴定山梨醇阴性肠道病原体，如肠道致病菌——大肠杆菌（*Escherichia coli*）。

c. 血液在肉汤中进行初始培养。根据分离的细菌的特征，传代培养在麦康基氏（MacConkey）琼脂（革兰氏阴性）或巧克力琼脂（革兰氏阳性）上进行。

如果要分离和鉴定临床相关的病原体，必须获得适当的样品。临床医生必须确保样品来源于被感染的部位。如果不能获得足够的样品，那么发现病原体只能是一纸空谈。当然，样品必须在无菌条件下获取，以防止污染。同时还必须确保病原体生长代谢所需的条件，如厌氧条件等。样品一旦获得必须尽快进行分析。

生长培养基和培养

富集培养（enrichment culture），选择合适的培养基和培养条件从样品中分离微生物（见 18.1 节），是临床微生物学的一个重要组成部分。尽管大多数重要的临床微生物可以通过各种专用培养基进行培养、分离和鉴定，但是许多临床样品需要首先在能够支持多数好氧和兼性厌氧微生物生长的通用培养基（general purpose media）上培养，如血琼脂培养基等（图 21.18 和表 24.1）。由于滋养培养基（enriched media）中添加了能促进有特殊代谢需求微生物生长的特殊生长因子，因此它适用于培养这类微生物，如引

起淋病的淋病奈瑟氏球菌（*Nesseria gonorrhoeae*）（表 24.1）。某些培养基为选择培养基（selective media），由于添加了特定的培养基成分，它们只能促进某些微生物生长而抑制其他微生物生长（表 24.1）。最后一类为鉴别培养基（differential media），它是一种特殊的培养基，可以通过病原体在该培养基上的生长和外观鉴定病原体（图 24.7）。

血液培养

菌血症（bacteremia）是血液中有细菌存在（见 21.7 节）。菌血症在健康个体中非常少见，通常只是在伴随口腔或外伤病原体入侵时短暂存在，如果血液中长期有菌存在通常意味着系统感染。血液中发现的绝大多数病原体包括铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、肠道细菌（enteric bacteria），尤其是大肠杆菌（*Escherichia coli*）和肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*），此外还有革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）和酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）。

败血症（septicemia）是一种血液感染，是由有毒菌体从感染病灶进入血液并在血流中大量繁殖，进入身体各个组织开始新的感染而造成的。败血症会导致严重的系统症状，包括发热、寒战及体力衰竭。严重时败血症会导致脓毒性休克（septic shock），一种具有生命危险的情况是血压严重降低并伴有多器官包括心脏、肾脏和肺功能失调。血液培养是提供唯一快速分离和鉴定致病因子的方法，通过谨慎并且适当的血液培养而做出诊断。

标准的血液培养过程如下：首先从静脉取 20ml 血样，把它注入一个盛有抗凝剂和多种营养成分培养基的血液培养瓶中，其中一瓶在有氧条件下，另一瓶在厌氧条件下，置于 35℃培养，每小时在自动化系统中检查几次，共检查 5 天。大多数有临床意义的细菌在两天时间内就可以培养出来，但是有些需要复杂营养的微生物需要 3～5 天的时间才能培养出来。一些血液分离系统使用了一些能引起红细胞和白细胞溶解的化学物质，促使细胞溶解并释放出其中的病原体。血液培养中的微生物通常可以在自动化检测系统中用表示微生物生长的指示剂检测，也可以用显微镜观察和传代培养法来测定。自动血液培养系统通过检测 CO_2 产量和混浊度，测定微生物生长情况，检测频率为每 10min 一次。

在抽血时，难免会有皮肤表面的微生物对血样污染，但污染率应该控制在 2%～3%。通常，血液培养物的污染物是皮肤上常见的细菌，如金黄色葡萄球菌、棒形杆菌（coryneform bacteria）和丙酸杆菌（propionlibacteria）等。而这些细菌偶尔也能引起心脏的感染（细菌性心内膜炎）。因此，当判断血液培养结果时，重视微生物学和临床方面的实践经验是很必要的。

尿液培养

尿道感染是非常普遍的，尤其是女性。引起感染的病菌常常就是普通的细菌（如大肠杆菌）。因此，在尿液细菌学分析的过程中要格外细心。通常情况下，尿道感染是由于细菌从外界进入尿道直至感染膀胱。尿道感染是最常见的医院感染（nosocomial，医院获得性感染，见 25.7 节）。

典型的尿道感染常使每毫升清洁的尿样中含有 10^5 个或更多数量的细菌，而在未感

染情况下，外生殖器对尿液造成的污染，1ml 尿样不超过 10^3 个细菌（这相当难避免）。最普通的尿道感染菌是肠道细菌的成员，其中 *E. coli* 占 90%以上，其他还有克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、变形菌属（*Proteus*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、腐生葡萄球菌（*Staphylococcus saprophyticus*）和粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）等。引起淋病的淋病奈瑟氏球菌并不能在尿液中生长，而可以在尿道上皮细胞中生长，这必须用不同的方法来诊断（见后）。

直接用显微镜观察尿样可以用来确定菌尿症（bacteriuria），如尿样中细菌的数目出现异常。然而，由于几乎所有的尿液中都有一定的细菌生长，因此，某些典型的细菌可利用商业化的通用量度计对其进行检查。例如，其中一种方法是通过试纸条检测尿样中硝酸盐还原产物——亚硝酸盐的数量来确定。当尿液中的细菌数目达到一定量时（10^5 个/ml 以上），会产生亚硝酸盐。试纸条颜色变化显示检测结果呈阳性（图 24.3），所以，上述方法对尿道感染来说实际上可以随时快速检查。另一种尿道感染的指示检测也与亚硝酸盐还原有关，即测定脂酶（由白细胞产生，见 22.1 节）和过氧化物酶（多种细菌都可以产生，见 6.15 节和 17.22 节）。试纸条试验时尿样培养物常呈阳性反应。

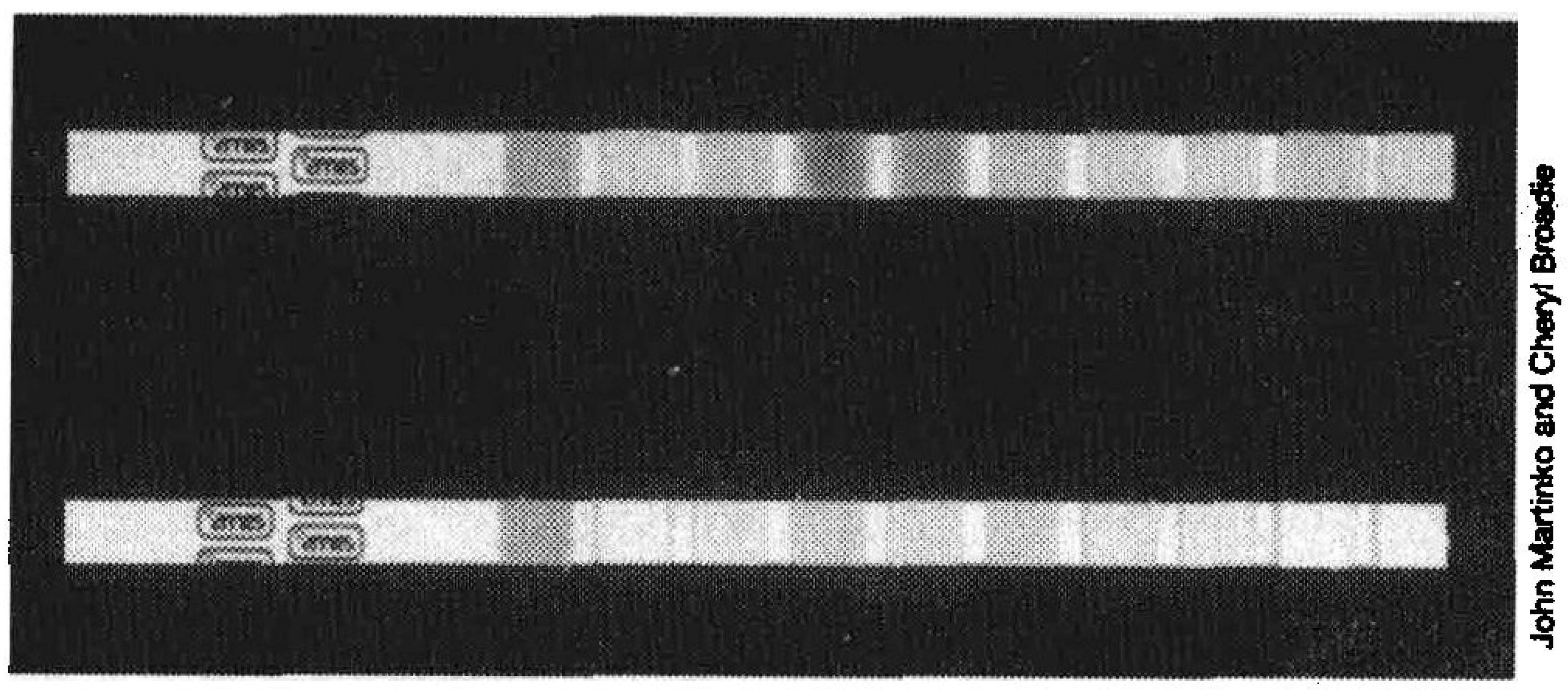


图 24.3　试纸条法尿检。检测试纸条下面的是对照试纸条。从左到右，试纸条依次显示尿样中反常的葡萄糖、胆红素、酮类、比重、血、pH、蛋白质、尿胆素原、亚硝酸盐、白细胞（酯酶）。当酯酶反常时条带为阳性（最右边），亚硝酸盐反常时条带为较强的阳性（右边数第二条带）表示患有菌尿症，接下来根据样品培养实验看是否有大肠杆菌存在。

也可以对尿样直接进行革兰氏染色（见 4.1 节）区分细菌的种类并根据它们的形态特征确定潜在的尿道致病菌。包括革兰氏阴性杆菌 [肠道细菌（enteric bacteria），见 12.11 节]、革兰氏阴性球菌 [奈瑟氏球菌属（*Neisseria*），见 12.10 节] 和革兰氏阳性球菌 [肠球菌属（*Enterococcus*），见 12.19 节]。革兰氏染色和其他直接染色方法对其他体液中（如唾液）的细菌检测也是非常有用的（见 26.5 节）。

为培养潜在的尿道病原菌，常用的两种培养基有：①血琼脂培养基，它是一种无选择的一般培养基；②用于肠道细菌培养的选择培养基，如麦康基氏或伊红美蓝琼脂（EMB，见 24.2 节和图 24.4）。这些特殊的培养基可以初步区分乳糖发酵菌和非乳糖发酵菌，同时还可以抑制革兰氏阳性菌，如葡萄球菌属（*Staphylococcus*）（普通皮肤污染菌）的生长。有经验的临床微生物学家可以通过观察不同选择培养基（表 24.2）上长出的病原菌的菌落颜色和形态来区分分离到的菌株。这种鉴定必须与更详细的分析相

结合，临床微生物学家往往用这种方法与更详细的试验结果一起分析得到鉴定结果，这些内容将在本章后面的部分中详细讨论。

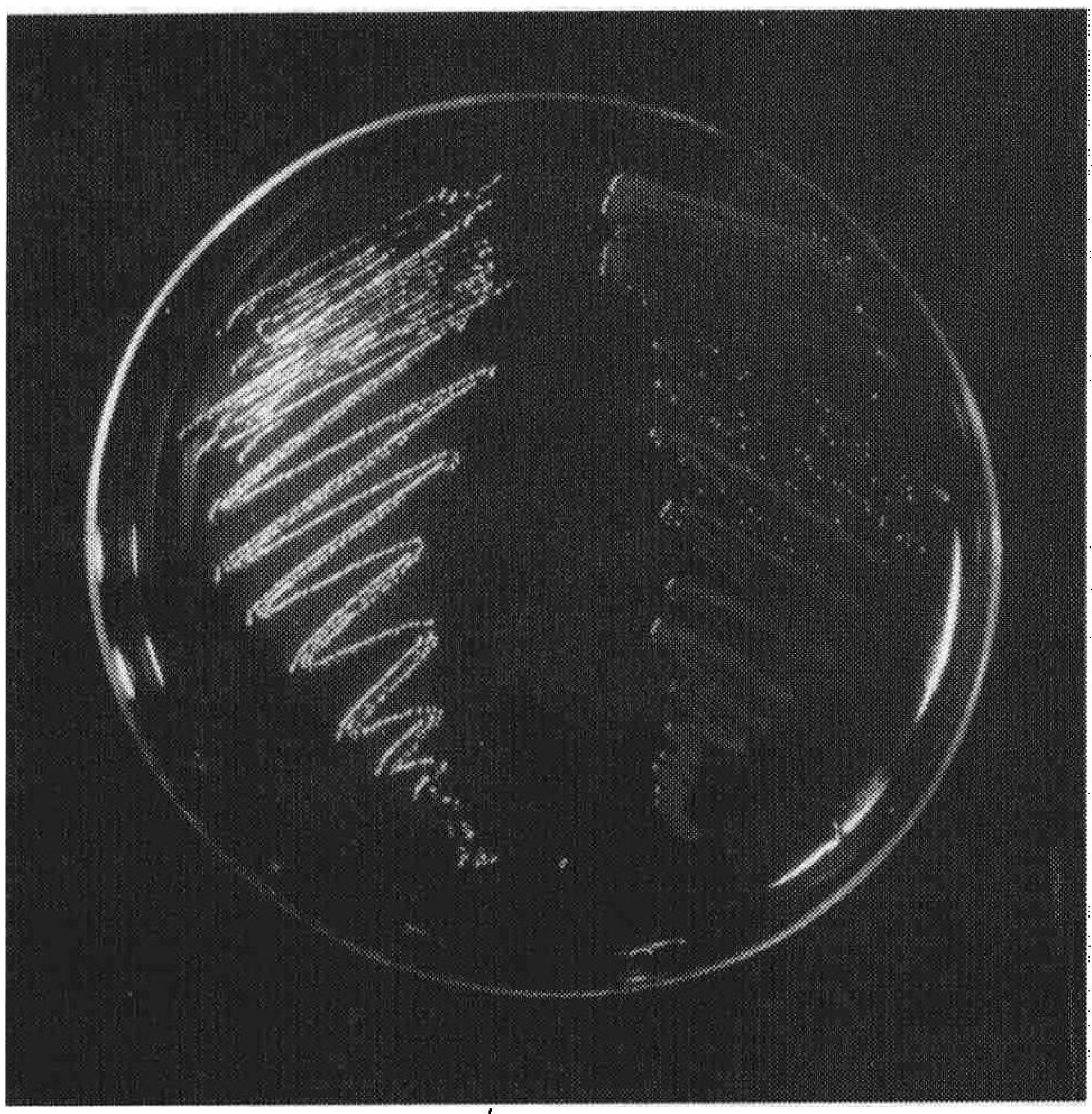


图 24.4 伊红美蓝（EMB）琼脂平板。这个平板显示的是乳糖发酵型细菌大肠杆菌（*E. coli*）（左）和非乳糖发酵型细菌铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*）（右）。注意大肠杆菌菌落呈带有金属光泽的绿色。

表 24.2 在不同诊断培养基上培养的常见革兰氏阴性杆菌的菌落特征

菌名	琼脂培养基[a]				
	EMB	MC	SS	BS	HE
大肠杆菌（*E. coli*）	中心黑色带有绿色金属光泽（图 24.4）	红色或粉色	红色或粉色	大多被抑制	黄色到粉色
肠杆菌属（*Enterobacter*）	和大肠杆菌（*E. coli*）类似，菌落通常大些	红色或粉色	白色或米色	黏胶状菌落有银色光泽	黄色到粉色
克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）	菌落大，黏液状，棕色	粉色	红色到粉色	大多被抑制	黄色到粉色
变形菌属（*Proteus*）	无色透明	无色透明	中心黑色边缘清晰	绿色	清晰
假单胞菌属（*Pseudomonas*）	透明、无色到金色（图 24.4）	无色透明	大多被抑制	不生长	清晰
沙门氏菌属（*Salmonella*）	透明、无色到金色	无色透明	不透明	黑色到墨绿	绿色或中心黑色边缘透明
志贺氏菌属（*Shigella*）	透明、无色到金色	无色透明	不透明	棕色或抑制	绿色或透明

资料来源：Murry P R，Baron E J，Jorgenson J H. 2003. American Society for Microbiology，Washington，D C。

a. BS，亚硫酸铋琼脂；EMB，伊红美蓝琼脂；MC，麦康基氏琼脂；SS，沙门氏-志贺氏菌属（*Shigella*）琼脂；HE，郝克通肠道琼脂。

最后，如果有持续的尿道系统感染症状而又没有细菌生长，医生大概需要培养那些

比较难培养的微生物，特别是淋病奈瑟氏球菌、砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）、布兰汉氏球菌属（*Branhamella*）、支原体或其他一些厌氧菌。

粪便培养

正确收集和保存粪便对肠道病原菌的分离是很重要的。在保存过程中，粪便的 pH 会下降，所以必须避免采样和样品处理之间的时间拖延。这对分离志贺氏菌属（*Shigella*）和沙门氏菌属（*Salmonella*）尤为重要，因为这两种菌对 pH 非常敏感。

新采集的粪便样品需要放入盛有磷酸缓冲液的小瓶送到实验室。粪便中如含有血或脓液，以及怀疑食物或水引起感染的患者的便样需要接种到不同的选择培养基上进行培养（见 24.2 节）以分离特殊细菌。肠道寄生虫不用培养的方法检测，而是通过用显微镜观察粪便样品中的包囊或者通过抗原检测进行分析（见 24.5 节～24.11 节）。多数实验室还采用各种选择培养基及不同的培养基和培养条件鉴定大肠杆菌 O157：H7 和弯曲杆菌属（*Campylobacter*），这两种重要的肠道病原菌通常可以从受食物或水感染患者的粪便中分离出来（见 29.8 节和 29.9 节）。

伤口和溃疡

外伤如动物或人的咬伤、烧伤、刀伤或异物刺伤等，引起的感染必须很小心地取样，这样才能得到相关的病原体。这是因为伤口感染和溃疡通常被正常菌群所污染，从这些部位取得的样品会经常引起误诊。对于溃疡和其他脓肿，最好的取样方法是用无菌注射器的针头沿着未被感染的皮肤表面深入患部吸取脓液。内部感染的脓液可以从活组织取样或从外科切除组织中取样。

与伤口感染有关的病原菌有很多种，其中一些是厌氧菌。因此，正确的检测方法是取样、运送和培养要同时在有氧和无氧条件下进行。例如，和化脓有关最常见的病原体是金黄色葡萄球菌，但一些肠道细菌如铜绿假单胞菌和厌氧的拟杆菌属（*Bacteroides*）、梭菌属（*Clostridium*）也较常见。常用的分离培养基是血琼脂，几种肠道细菌选择培养基（表 24.1 和表 24.2）及为培养厌氧菌而设计的添加或减少某种成分的血琼脂，同时还要通过革兰氏染色在显微镜下直接观察。

生殖系统样品和淋病的实验室诊断

对许多男性而言，化脓性的尿道流出物是淋病的典型症状（见 26.12 节）。如果没有流出物，可以通过以下步骤取样：用一个无菌的小棉球插入感染尿道内，停留几秒钟，吸收一些渗出液，然后取出进行淋病的媒介——淋病奈瑟氏球菌的培养。或者用另一种方法，即用患者凌晨的尿样，其中通常含有大量的淋病奈瑟氏球菌。女性如怀疑感染淋病或其他生殖系统感染，同样也可通过棉球擦拭子宫颈和尿道获取样品。

临床微生物检测对于淋病的诊断是非常重要的步骤。淋病奈瑟氏球菌［临床上称作淋球菌（*gonococcus*）］主要生长在尿道、子宫颈、肛门、喉咙和结膜的黏膜表面。它对干燥非常敏感，因此，淋球菌几乎都是通过人与人的直接接触，尤其是性接触传播的。微生物检测在淋病的公共预防措施——鉴别无症状淋球菌携带者中是非常必要的。

淋球菌是 G^- 双球菌，而类似的细菌在一般尿道菌群中并不很常见。因此，革兰氏

染色后直接镜检很有价值。例如，镜检尿道、阴道或宫颈分泌物涂片中的革兰氏阴性双球菌是诊断淋病最有力的证据。在淋病急性期，显微镜下经常看到多形核白细胞中被吞噬的 G^- 双球菌（见 22.2 节，图 24.5a）。

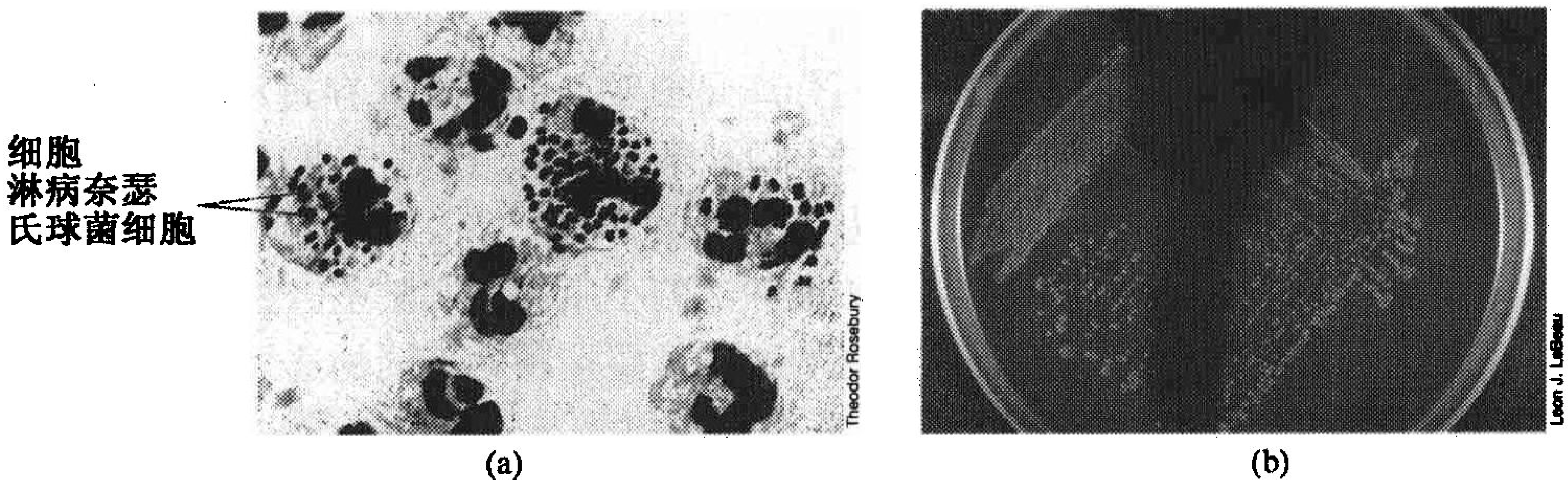


图 24.5 淋病奈瑟氏球菌（*N. gonorrhoeae*）的鉴定。（a）人尿道分泌液来源的多形核白细胞中的淋病奈瑟氏球菌的显微镜照片，注意这些菌呈现出双球状（图中标记）。（b）淋病奈瑟氏球菌在 Thayer-Martin 培养基上生长，平板中间位置用与细胞色素 c（氧化酶实验）反应变蓝色的试剂染色，淋病奈瑟氏球菌为氧化酶阳性。

许多实验室利用核酸探针或核酸扩增检测泌尿生殖系统样品中的淋病奈瑟氏球菌（通常还同时检测样品中的砂眼衣原体）。但是，从泌尿生殖系统以外，如眼和直肠，取得的样品检测前首先需要进行培养。

培养淋球菌的大多数培养基含有加过热的血液或者血红蛋白［因这种培养基呈深棕色而被称为巧克力琼脂（chocolate agar）］，加热会形成沉淀物，这些沉淀物对吸收存在于琼脂或培养基其他成分中的有毒物质非常有效。另一种用于淋球菌的选择分离培养基叫做 Thayer-Martin（MTM）琼脂（图 24.5），这种培养基中含有的抗生素（万古霉素、制霉菌素和黏菌素）可以抑制常见菌群的生长而不会影响临床分离的淋球菌的生长，因为它们对这些抗生素有天然的抗性（见 26.6 节）。

平板划线后，要在含有 3%～7% CO_2 的潮湿环境中培养（CO_2 对淋球菌的生长是必需的）。24h 和 48h 后观察生长情况，并立即用氧化酶反应测试菌落，因为所有的奈瑟氏球菌属（*Nesseria*）对氧化酶反应均呈阳性。这样，在巧克力琼脂上生长的氧化酶阳性、革兰氏阴性的双球菌就可推测为淋球菌，前提是接种物来自泌尿生殖系统。不过，还需要根据其对糖的利用、免疫学或核酸探针等测定做进一步鉴定（见 24.5 节～24.12 节）。

厌氧菌的培养

专性厌氧细菌是引起感染的常见菌。分离和鉴定厌氧病原体需要特殊的分离和培养方法。一般来说，用来培养厌氧病原体的培养基和用来培养好氧病原体的培养基不需要有太大的差别，除非它们①有机物成分比较丰富，②含有还原型组分（如半胱氨酸或巯基乙酸盐），③含有氧化还原指示剂（见 6.15 节）。由于氧对厌氧微生物具有毒性，样品的采集、加工和处理过程中都要避免接触氧气。

人体中有几处厌氧菌栖息地（如口腔和肠道）（见 21.3 节和 21.4 节），这些地方通常是缺氧的，可以发现在这些部位专性厌氧菌是正常菌群的一部分。然而，身体的其他

部位因组织损伤、外伤或血液供应问题也可以成为缺氧环境。那么，这些区域就很适合专性厌氧菌的繁殖。一般来说，致病性厌氧菌是正常菌群的一部分，而且仅是机会致病菌。两种重要的致病性厌氧菌是破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）（引起破伤风的病原菌）和产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）（可导致坏疽病和血毒症），这两种形成内孢子的细菌在土壤生物体中占主导地位。

厌氧培养工作常遇到的问题是样品被氧污染和需要设法保持微生物的厌氧生长环境。抽取或活体解剖取得的样品必须立即放入盛有少量还原剂稀释液，如巯基乙酸盐和氧化还原指示剂刃天青（besazurin）的无氧试管中。这种染料在还原状态时是无色的，当被氧化时既变为粉红色，因此可以快速显示样品是否被氧污染。如果无法获得无氧试管运送样品，也可用注射器运送，只要将针头扎进灭菌的橡皮塞中就可以防止氧气进入注射器污染样品。

为了做到厌氧培养，琼脂平板要放在密封的罐中，罐可用下列方法做成无氧环境，用非氧气体取代罐中的空气（经常使用的是 N_2 和 CO_2 的混合物），或者在密闭容器中加入一些试剂，它可以和 O_2 反应去除空气中的 O_2。例如，充入 H_2，在适当的催化剂存在时（常用的有钯），由于 H_2 可以和游离的 O_2 结合形成 H_2O，便可以除去 O_2（图 24.6）。其他可以提供一些缺氧环境的方法还有含有还原剂的培养基、无氧的套箱或一个充满氮气和氢气的手套箱（图 6.26b）。

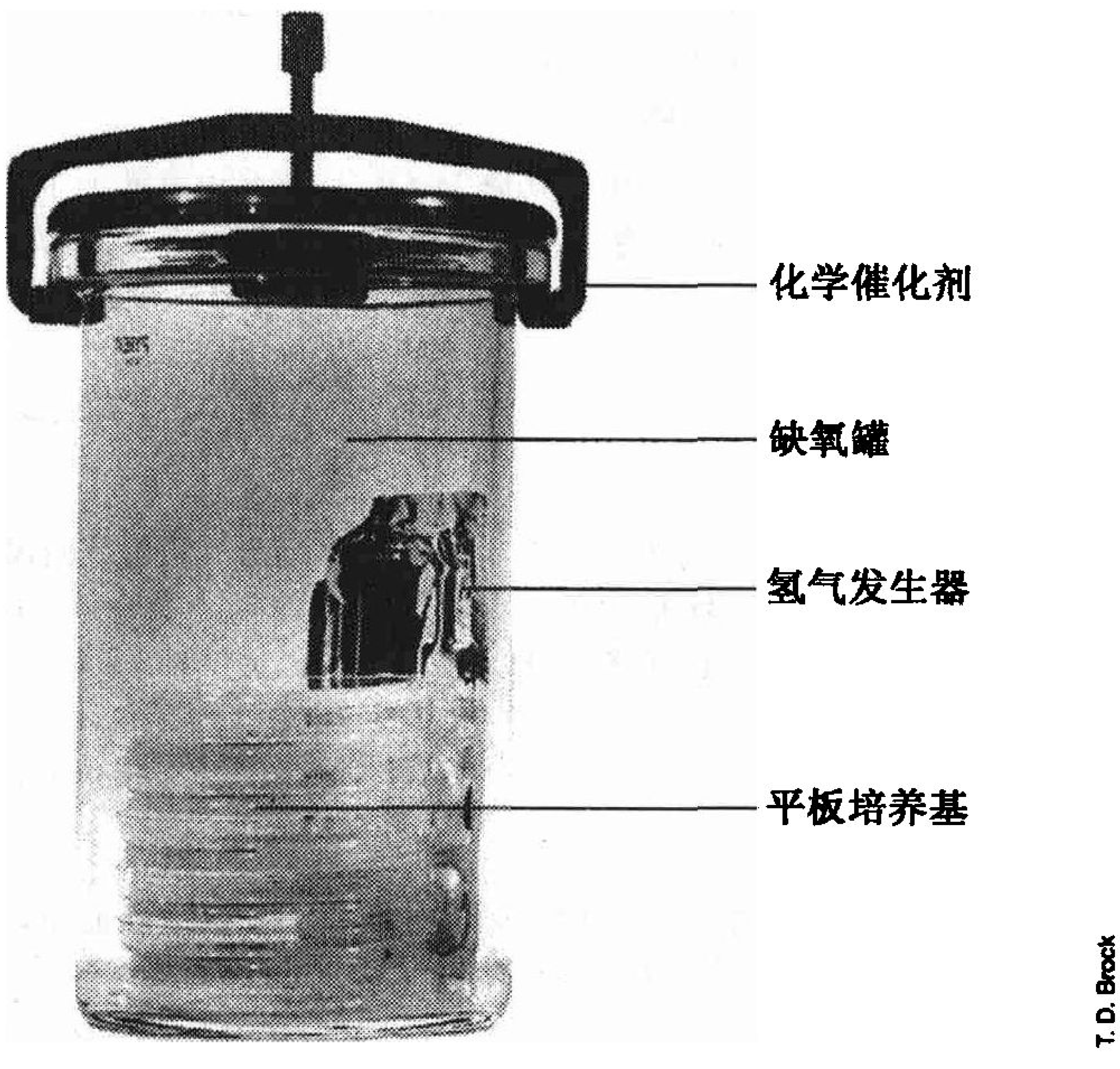


图 24.6　用于无氧培养的密封罐。催化剂和氢气发生器维持还原（厌氧）环境。

概念检查

正确的取样和培养可疑病原体是鉴定致病微生物的可靠途径。选择合适的取样和培

养条件需要了解微生物生态学、生理学和营养方面的知识。

◆ 为什么尿样培养总有微生物生长?

◆ 列举成功分离厌氧病原体需要注意的事项。

24.2 生长依赖性鉴定方法

如果用基础培养基就能使细菌生长，那么临床微生物学家就可以鉴定这种细菌。鉴定临床分离物往往用各种生长依赖性试验，这里我们讨论其中几种。

在选择和鉴别培养基上生长

以微生物在基础分离培养基上的生长特征为基础，将未知病原菌接种到可以测定它的一种或多种生化反应的培养基上进行培养。最重要的一些实验总结在表 24.3 中。很多特殊的培养基现已做成小型化试剂盒，这种小试剂盒上有很多孔，每个孔中分装不同的培养基，可以同时接种以考察某种病原菌在不同培养基上的生长状况（图 24.7）。

表 24.3 重要的细菌临床诊断试验

试验	原理	过程	用途
糖发酵	利用糖或糖醇发酵生长中产生的酸和（或）气体	肉汤培养基，加入糖和酚红作为 pH 指示剂，插入杜氏管检测气体	肠道细菌分型
过氧化氢酶	酶分解过氧化氢 H_2O_2	稠密培养基中加几滴 H_2O_2，观察是否有 O_2 产生（图 6.29）	区分梭菌属（*Clostridium*）（－）和芽孢杆菌属（*Bacillus*）（＋），小球菌属（*Micrococcus*）-葡萄球菌属（*Staphylococcus*）（＋）和微球菌属（*Micrococcus*）-链球菌属（*Streptococcus*）
利用柠檬酸	利用柠檬酸作为唯一碳源，会导致培养基碱化	柠檬酸培养基，加入溴酚蓝作为 pH 指示剂，看是否变为深蓝色（碱性 pH）	区分克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）-肠杆菌属（*Enterobacter*）（＋）和埃希氏菌属（*Escherichia*）（－）；爱德华氏菌属（*Edwardsiella*）（－）和沙门氏菌属（*Salmonella*）（＋）（图 24.7）
凝固酶	酶导致血浆凝集	将血浆和稠密细菌悬浮液混合培养，看是否产生浆状沉淀	区分金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）（＋）和表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）（－）
脱羧酶（赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸）	分解氨基酸，产生 CO_2 和胺	培养基中补加氨基酸，如果存在酶反应，则溴甲酚紫（pH 指示剂）会变紫	有助于从肠道细菌中鉴定细菌种群
β-半乳糖苷酶（ONPG）试验	ONPG 是酶的人工合成底物，当底物被水解，就形成硝基酚（黄色）	将 ONPG 和染色的悬浮液一起培养，看是否产生黄色	区分柠檬酸杆菌属（*Citrobacter*）（＋）和沙门氏菌属（*Salmonella*）（－）；鉴定某些志贺氏菌（*Shigella*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）

续表

试验	原理	过程	用途
明胶液化试验	许多蛋白酶水解明胶，破坏凝胶	培养含 12%明胶的肉汤。冷却检查凝胶形成。如果明胶被水解，试管在冷却后会保持液体状态	有助于鉴定沙雷氏菌属（*Serratia*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、黄杆菌属（*Flavobacterium*）和梭菌属（*Clostridium*）
H_2S产生试验	破坏含硫氨基酸或还原硫代硫酸盐时会产生 H_2S	检测 H_2S 可用含 Fe 的丰富培养基，若产生 H_2S 则会形成黑色的硫化铁	在肠道细菌中有助于鉴定沙门氏菌属（*Salmonella*）、爱德华氏菌属（*Edwardsiella*）和变形菌属（*Proteus*）（图 24.7）
吲哚试验	蛋白质中的色氨酸转化为吲哚	用二甲基-氨基-苯甲醛（红色）检测培养基在培养过程中是否产生吲哚或用涂有二甲氨基肉桂醛（斑点试验，蓝色）的纸检测菌落是否产生吲哚	区分埃希氏菌属（*Escherichia*）（＋）和克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）（－），肠杆菌属（*Enterobacter*）（－）；爱德华氏菌属（*Edwardsiella*）（＋）和沙门氏菌属（*Salmonella*）（－）；变形菌属（*Proteus*）（＋）和奇异变形菌（*Proteus mirabilis*）（－）
甲基红试验	混合酸发酵产生充足的氨基酸，使 pH 降至 4.3	葡萄糖肉汤培养基，培养后向其中一个样本中加入甲基红指示剂	区分埃希氏菌属（*Escherichia*）（＋）培养物变红和肠杆菌属（*Enterobacter*），克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）（－），培养物变黄
硝酸盐还原	硝酸盐作为电子受体，还原成 NO_2^- 或 N_2	含硝酸盐的肉汤。培养后，加入 α-萘胺-对氨基苯磺酸（红色）。若为阴性，证明 NO_3^- 依然存在，补加锌粒使 NO_3^- 还原为 NO_2^-。如果加入锌粒后无颜色，则证明 NO_3^- 还原为 N_2	有助于鉴定肠道细菌（通常为阳性）
氧化酶试验	细胞色素 c 氧化人工电子受体：四氨基对苯二胺（Kovac's 试剂）或二甲基对苯二胺（Gordon 和 Mcleod 试剂）	将菌落涂在浸有试剂的纸上，氧化酶阳性菌在浸有 Kovac 试剂的纸上 10～15s 后显暗紫黑色；在浸有 Gordon 和 Mcleod's 试剂的纸上 10～30min 显蓝色	分离奈瑟氏球菌属（*Nesseria*），莫拉氏菌属（*Moraxella*）(＋）和不动杆菌属（*Acinetobacter*)(－）。假单胞菌属（*Pseudomonas*)(＋)，弧菌科（*Vibrionaceae*）(＋）和肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*)(－)；有助于鉴定气单胞菌属（*Aeromonas*)(＋)
氧化-发酵（O/F）试验	一些生物体只有在有氧生长情况下才产酸	产生的酸在含糖的培养试管上部，培养中使用软琼脂可以防止混合	可以区分微球菌属（*Micrococcus*）（＋）和链球菌属（*Streptococcus*）（可在无氧情况下产酸）；区分假单胞菌属（*Pseudomonas*）（＋）和肠道细菌（－）
苯丙氨酸脱氨酶试验	脱脒基作用产生苯丙酮酸，而产物能被比色试验测定	培养基富集苯丙氨酸。经培养之后，加入氯化铁观察是否变绿	区分变形菌属（*Proteus*）和普罗威登斯菌属（*Providencia*）

续表

试验	原理	过程	用途
淀粉水解实验	淀粉遇碘液变蓝	生物体在含有淀粉的平板上生长，用标记的碘液冲洗平板观察菌落周围是否存在清晰区	鉴定典型的水解淀粉细菌，如芽孢杆菌属（*Bacillus*）多个种
脲酶试验	尿素（$H_2N—CO—NH_2$）分解为 $2NH_3+CO_2$	培养基含2%的尿素和酚红指示剂，氨气释放使pH升高，加深粉红色	区分克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）（+）和埃希氏菌属（*Escherichia*）（－）。区分葡萄球菌属（*Staphylococcus*）（+）和普罗威登斯菌属（*Providencia*）（－）
V-P试验	糖发酵产生3-羟基丁酮	用α-萘酚测定3-羟基丁酮	区分克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）（+）、肠杆菌属（*Enterobacter*）（+）和埃希氏菌属（*Escherichia*）（－）。鉴定芽孢杆菌属（*Bacillus*）（+）

这些培养基可用于选择培养、鉴别培养或二者兼顾。选择培养基是在培养基中添加一些可以选择性地抑制某些微生物生长的物质。鉴别培养基是在培养基中加入一些指示剂，通常是染料，可以显示生长过程中不同的生化反应。例如，伊红美蓝琼脂培养基（eosin-methylene blue，EMB）就是被广泛应用的选择培养基和鉴别培养基。EMB用于分离肠道中的革兰氏阴性菌。美蓝能抑制多种革兰氏阳性菌的生长。伊红是对pH敏感的染料，在酸性条件下可从无色变为黑色。EMB琼脂培养基中含有乳糖和蔗糖作为能源，但不含葡萄糖。乳酸发酵菌（常为肠杆菌）如大肠杆菌、克雷伯氏杆菌属、肠杆菌属，因为产酸而使培养基变黑并呈现绿色金属光泽。非乳酸发酵菌如沙门氏菌属、志贺氏菌属和假单胞菌属，其菌落是透明的或粉色的（图 24.4）。这样，EMB培养基不仅可以选择性地使革兰氏阴性菌生长而且还可以区分出几个属的革兰氏阴性菌。

不同的生化反应用来检测病原菌是否含有对某种底物或不同培养基中某些底物分解的一些酶。糖发酵可根据pH指示剂颜色变化来检测（图 24.7a）。发酵过程中所产生的氢气或二氧化碳气体，可用气体收集器来检测，或在琼脂中有气泡存在（图 24.7a，b）。硫化氢气体产生可用培养基中的三价铁离子来指示；如果有硫化氢产生，则 Fe^{3+} 和 H_2S 反应生成 FeS 黑色沉淀（图 24.7b）。柠檬酸是一种含有三个羧基的有机酸，因此柠檬酸的利用伴随pH的上升，在实验培养基中加入特殊染料，这种染料在碱性条件下颜色会变化，以培养基颜色发生变化来证明柠檬酸的利用情况（图 24.7c）。在临床应用中，已发展了数百种不同的实验，但只有20种左右被广泛应用（图 24.7d）。

大量病原菌的生化反应特征已经存入计算机数据库，一旦未知菌的不同生化反应结果被输入，计算机将结果与数据库中的信息相比较，得出最佳结论。对于许多微生物而言，根据3或4种关键性实验结果就可以明确的鉴定。在一些可疑的实验中需要进行更精细复杂的鉴定。

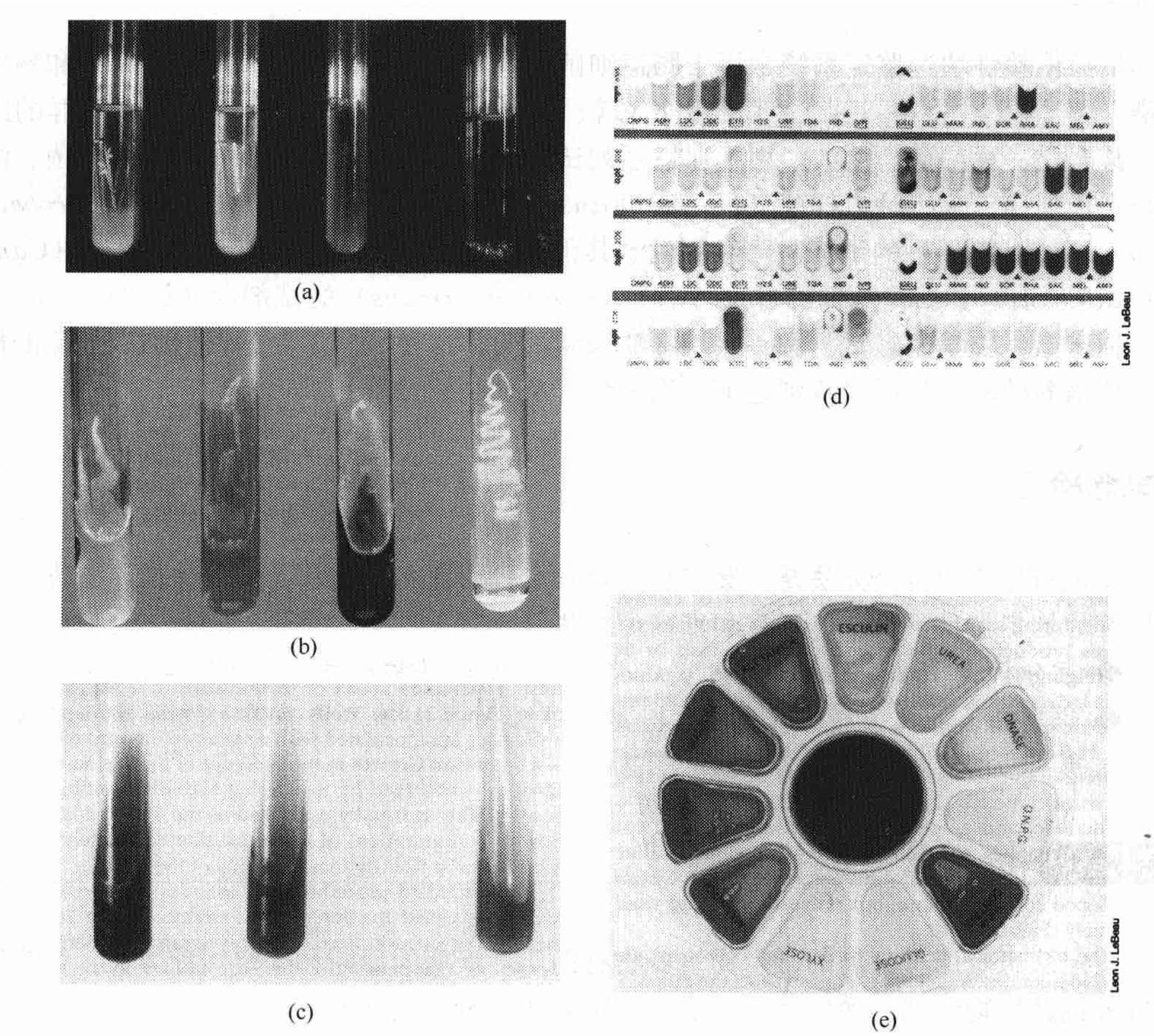


图 24.7　根据临床分离微生物在不同诊断培养基上的颜色变化进行鉴定的生长依赖性诊断方法。(a) 用鉴别培养基鉴别糖发酵。产酸实验通过在液体培养基中加入的 pH 指示剂的颜色变化进行表征。如果有气体产生，每个试管中的倒立的玻璃管中会有气泡出现。从左到右：产酸、产酸和气、阴性、空白对照。(b) 一种用三糖铁琼脂培养基 [triple sugar iron (TSI) agar] 检测肠道细菌的常规诊断方法。培养基不仅要在表面接种还要通过穿刺在琼脂内部接种。培养基中含有少量的葡萄糖及大量的乳糖和蔗糖。微生物在琼脂内部只能发酵葡萄糖产酸，而乳糖和蔗糖发酵微生物也可以在培养基表面产酸。产气可以从琼脂内部破裂情况进行判定。产硫化氢（由于蛋白质降解或培养基中硫代硫酸盐还原）通过 H_2S 和培养基中的 Fe^{3+} 反应产生黑色物质来判定。从左到右：只发酵葡萄糖、反应阴性、产硫化氢、发酵葡萄糖和另一种糖。(c) 利用西蒙氏枸橼酸盐琼脂培养基检测沙门氏菌属利用枸橼酸的情况。pH 变化通过指示剂颜色变化来表征。从左到右：阳性、阴性、未接种。(d) 用于临床分离微生物快速鉴定的试剂盒。其基本原理和 (a) 相同，但是被小型化安排，以便可以同时检测大量样品。有四个独立的区域，每个区域有不同的培养基，如图所示。(e) 小型化检测试剂盒的另外一种布局。用来检测非发酵型微生物的糖利用情况。

临床诊断

生长依赖性快速鉴定系统常用于肠道细菌的鉴定，因为这些细菌常引起尿道和肠道感染（图 24.7，见 24.1 节）。其他生长依赖性快速诊断试剂盒适合鉴定其他类群的细菌，甚至是一种细菌。例如，用于通过系列试验鉴定金黄色葡萄球菌、酿脓链球菌、淋病奈瑟氏球菌、流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）或结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）的试剂盒已经问世。其他还有鉴定病原真菌白色假丝酵母（*Candida albicans*）和新型隐球酵母（*Cryptococcus neoformans*）的试剂盒（见 24.8 节）。

临床微生物学家经常要做一些特殊的诊断试验，这种试验主要是根据临床样品的性质、纯培养的基本特征（特别是革兰氏染色）及以往的经验。

概念检查

鉴定病原菌的传统方法是观察其生长过程中代谢变化。这种生长依赖性鉴定方法为病原菌的鉴定提供了快速、可靠和准确的方法。

◆ 试分析选择培养基和不同鉴定培养基的区别，并举出每种用途的培养基各一例。

◆ 说出合适的从下列样品中初步分离病原体所需的基本培养基、选择培养基或鉴别培养基：①尿样培养物，②血液培养物。

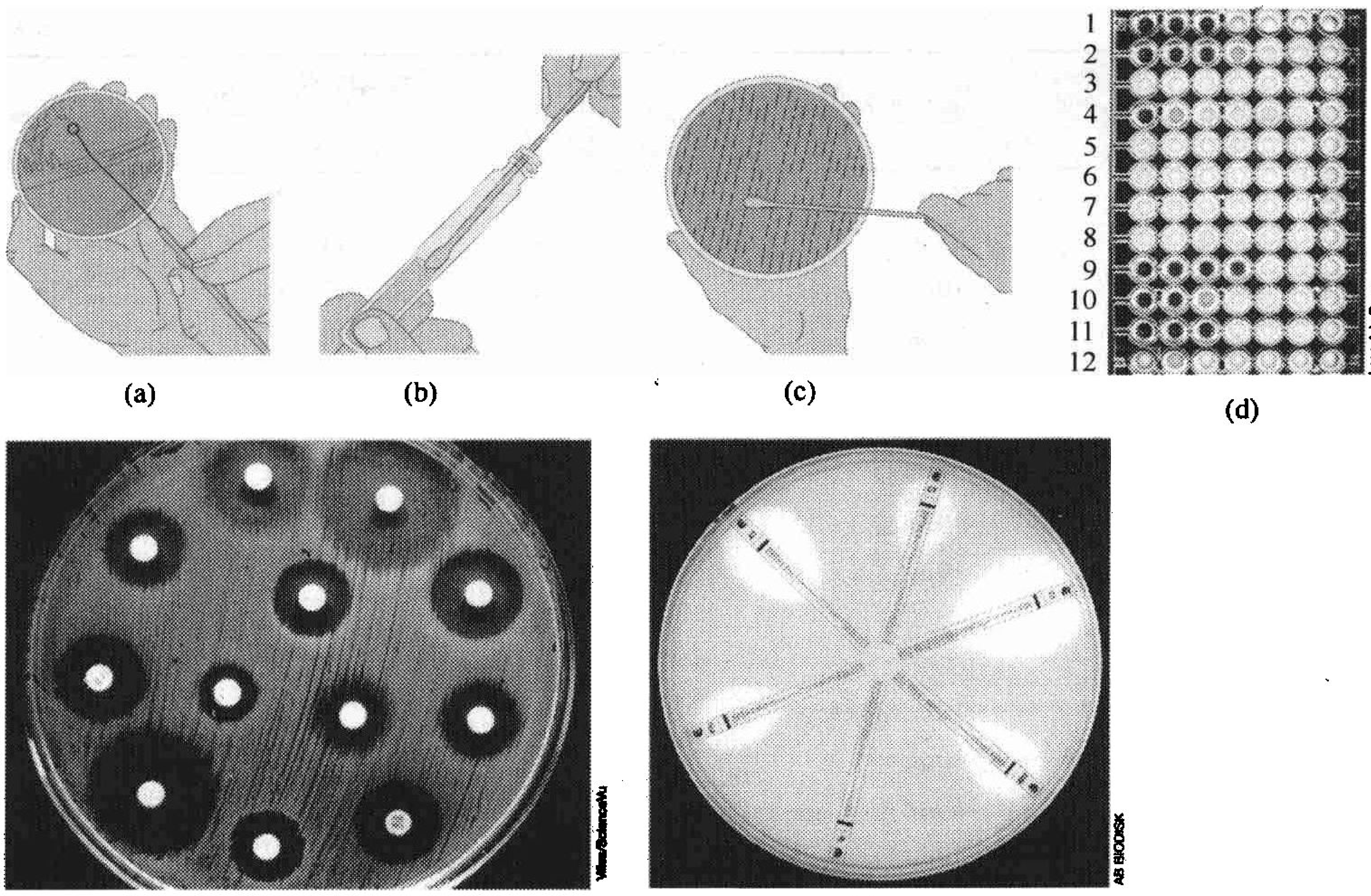
24.3 抗生素敏感性试验

鉴定从患者那里分离的微生物培养物有助于对疾病的诊断和确定治疗方案。微生物对各种抗微生物制剂的敏感性测定是一项重要的关爱健康任务。

我们在第 20 章中已经讨论了一些检测抗微生物活性的原则。通过琼脂扩散或试管稀释技术来确定抑制微生物生长的试剂的最小抑制浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）很容易测定细菌的敏感性（见 20.4 节）。美国食品和药品管理局（Food and Drug Administration，FDA）控制用于敏感性试验的自动分析仪，美国国家实验室诊断标准委员会（National Committee for Clinical Laboratory Standards，NCCLS）会经常修改试验的操作步骤和标准，包括每种微生物和抗生素的实验终点。美国国家实验室诊断标准委员会是一个非营利的标准制定机构，负责制定受舆论监督的非官方抗生素试验标准及其他和健康相关技术的标准（http://www.nccls.org）。

用 MIC 法测定抗生素敏感性的过程包括抗生素稀释试验（antibiotic dilution assay），在试管中（图 20.10）或在微孔板中进行（图 24.8e）。微孔中含有经过一系列的倍比稀释抗生素和标准接种量的待测微生物，微生物在含有不同抗生素的微孔中的生长情况可由浊度测定。敏感性是指完全抑制生长时抗生素的最大稀释度（highest dilution）（即最低浓度），此稀释度就是 MIC 的值。

一种标准的抗微生物活性评定方法叫做 Kirby-Bauer 法（图 24.8）。将培养的已知浓度的样品均匀地涂布于琼脂培养基上，把含有已知浓度（μg/片）的不同抗生素的滤纸片放在平板上，培养一段时间后，测定抑菌圈的大小。表 24.4 显示了几种抗生素典



(a)　(b)　(c)　(d)　(e)　(f)

图 24.8　抗生素敏感性试验。（a～e）Kirby-Bauer 法检测微生物抗生素敏感性的程序。（a）分离的菌落接种到盛有合适的液体培养基的试管中培养到一定的浓度，利用液体的浊度确定菌体浓度。（b）用灭菌棉签蘸取菌液，多余的液体通过在试管壁挤压棉签除去。（c）用棉签轻轻地在合适的琼脂培养基表面划线。（d）抗生素敏感性通过肉汤稀释法测定，所用的微生物为铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。各排的抗生素不同。微孔板可以自动完成该试验，终点是使微生物不能生长的抗生素浓度最低的孔，左边的孔中抗生素的浓度最高，往右依次是经过二倍稀释的系列抗生素浓度。例如，第一和第二排，终点是第三个孔，在第四排所有的孔中均有微生物生长，说明微生物对这种抗生素有抗性，在第四排第一个孔就是终点。（e）含有已知浓度抗生素的滤纸片放在琼脂培养基的表面，培养后就会出现抑菌圈，微生物的抗生素敏感性通过抑菌圈直径对照表获得（表 24.4）。（f）利用 Etest®测定各种抗生素的敏感性（从 8 点钟，PTc，哌拉西林/他唑巴坦；AT，氨曲南；CT，头孢噻肟；CI，环丙沙星；GM，庆大霉素；IP，亚胺培南）。每个塑料条都通过最大抑制浓度（MIC）进行校正，抗生素浓度从中间向边缘增大，抑制微生物生长的最低抗生素浓度就是 MIC 值（见 20.4 节）。例如，头孢噻肟 MIC 值是 16μg/ml。该菌对亚胺培南有抗性；MIC>32μg/ml。

型抑菌圈的大小，根据抑菌圈的直径确定对抗生素的敏感性，不同细菌对不同抗生素的比较标准由 FDA 或 NCCLS 提供。

表 24.4　抑菌圈法测定抗生素敏感性的标准[a]

抗生素	圆片上的含量	抑菌区直径/mm[b]		
		抗性	中性	敏感性
氨苄青霉素[c]	10μg	≤13	14～16	≥17
氨苄青霉素[d]	10μg	≤28	—	≥29
头孢曲松	30μg	≤13	14～20	≥21
氯霉素	30μg	≤12	13～17	≥18

续表

抗生素	圆片上的含量	抑菌区直径/mm[b]		
		抗性	中性	敏感性
氯洁霉素	2μg	≤14	15～20	≥21
红霉素	15μg	≤13	14～22	≥23
庆大霉素	10μg	≤12	13～14	≥15
卡那霉素	30μg	≤13	14～17	≥18
二甲氧基苯青霉素[d]	5μg	≤9	10～13	≥14
硝基呋喃托英	300μg	≤14	15～16	≥17
青霉素 G[e]	10 单位	≤28	—	≥29
青霉素 G[f]	10 单位	≤14	—	≥15
链霉素	10μg	≤6	7～9	≥10
磺胺药物	10μg	≤12	13～16	≥17
四环素	30μg	≤14	15～18	≥19
三甲氧苄二氨嘧啶-磺胺	1.25/23.75μg	≤10	11～15	≥16
妥布拉霉素	10μg	≤12	13～14	≥15
万古霉素[g]	10μg	≤14	15～16	≥17
万古霉素[h]	10μg	≤14	—	≥15

a. 标准根据 NCCLS 制定并实时更新，NCCLS 是一个非营利的标准制定机构，负责制定受舆论监督的非官方抗生素试验标准及其他和健康相关技术的标准（http://www.nccls.org）。

b. 图 24.8 一个标准的抗生素敏感性试验方法描述。

c. 应用于肠杆菌科（Enterobacteriaceae）。

d. 应用于葡萄球菌属（*Staphylococci*）和青霉素高度敏感菌。

e. 应用于葡萄球菌属（*Staphylococci*）。

f. 应用于一些诸如肠球菌属（*Enterococci*）的微生物，这些菌能导致一些系统感染，这种感染能被大剂量的青霉素 G 治疗。

g. 应用于肠球菌属（*Enterococci*）。

h. 应用于葡萄球菌属（*Staphylococci*）。

Etest®是瑞典一家公司建立的非扩散测定方法，这种技术将预先确定梯度的抗微生物试剂固定在预制的塑料条上，浓度梯度包括 15 个传统的二倍稀释法的跨度，包含 MIC 的所有稀释度。当用于琼脂平板表面时，这个梯度就从塑料条带传递到平板上，并可以在不同微生物生长特征鉴定的时间内保持稳定。过夜或更长时间的培养后，沿着塑料条带的中心轴线就会形成椭圆形的抑菌带，就可以从椭圆的边缘和预先校准的 Etest 条带的交点读出以 μg/ml 表示的准确 MIC 值。然后通过 FDA 或 NCCLS 提供的 MIC 数据库获得想要的数据。

因为抗生素的抗性广泛存在（见 20.12 节），所以抗生素敏感试验对从临床样本中分离的多数病原菌都是非常重要的。表 24.4 中列出的数据，对选择最好的抗生素治疗某种细菌的感染是非常有用的。尽管大多数公共获得性病原菌对许多种抗生素都是敏感的，然而，有些病原菌，如铜绿假单胞菌只对极少数药物敏感。

医院病原菌（nosocomial pathogen）是指那些从医院获得的病原菌，多数医院病原菌已对抗生素有了抗性，甚至少数病原菌对目前已知的所有抗生素都有了抗性（见 20.12 节）。因此，对于有效的化学治疗，这些菌的抗生素敏感性试验尤为重要。根据这种方法收集的药物敏感性信息，控制医院感染的微生物学家可以撰写周期性抗菌谱

(antibiogram) 报告，揭示临床分离到的病原菌对目前常用抗生素的敏感性。抗菌谱报告对于监测本地已知的病原菌和跟踪新出现的抗性病原菌尤为重要。

概念检查

抗微生物药物广泛用于感染性疾病的治疗，对病原菌的抗生素敏感性试验是保证有效化学治疗的关键。这种抗微生物药物治疗的严格手段通常只在健康保护的框架内应用。

◆ 描述 Kirby-Bauer 技术，对于各种微生物和抗微生物药物，这种结果说明什么？

◆ 抗微生物药物敏感性试验对于微生物学家、医师和患者，以及公共感染和医院感染的意义是什么？

24.4　微生物实验室的安全问题

微生物实验室尤其是临床实验室的实验人员及和他们接触的其他人员都具有非常大的受到感染的潜在危险。因此，必须制定严格的临床样品处理的实验室操作标准，以避免实验室中意外事故的发生。在美国，所有针对人或灵长类的组织器官进行研究的诊所或研究机构，都要依据法律要求，在进行所有与血源性病原体相关的操作时采取控制暴露接触的措施。这项法律的根本目的是防止操作人员被乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) (见 26.11 节) 和人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) (见 26.14 节) 感染。正是由于这些规定的严格性，才能保证操作人员不会受到任何病原体的感染。

实验室事故的两个重要起因是忽视操作的安全性和粗心大意。因此，适当的培训和强制建立安全操作规程可以预防事故发生。然而，不幸的是，大多数类型的实验室获得性感染都不是由于无意识的暴露接触或事故引起的，而是对患者样品进行常规操作时引起的。在对样品进行处理过程中产生的气状物是引起实验室操作人员感染的主要原因。临床实验室遵循以下安全操作规程 (在美国这是法律所要求的) 可以减少实验室人员感染病原体和非事故性实验室感染的数量。

1. 进行有害物质试验的实验室必须和其他实验室隔离，有关实验辅助人员也严禁入内。同时，这些辅助性人员也必须对实验室和实验操作的危险性有所了解。

2. 对有传染性的物质或废弃物，如样本、注射器和针头、已接种过的媒体、细菌培养物、组织培养物、实验动物、玻璃器皿、实验设备和平板等，必须进行适当的、严格的有效净化处理。如果有少量传染性物质泼洒出来，最好用浓度为 5.25% (高浓度) 的氯漂白溶液或其他适当的消毒剂进行净化处理。所有具有潜在传染性的废弃物都必须在合格的焚化炉内焚毁，或者交由持有执照的废弃物处理部门处理。

3. 在工作中需要接触传染性物质或疫苗 (如狂犬疫苗、小儿麻痹症疫苗或白喉-百日咳-破伤风疫苗) 的实验员必须针对这些物质进行免疫注射。需要接触人体或灵长类动物身体组织的实验人员必须注射 HBV 疫苗。

4. 所有的实验室样品都应该被视为潜在的传染物，因此在处理这些样品时必须采

取恰当的方式。这对防止感染肝炎尤为重要，因为相对而言血液样品带有肝炎病毒（hepatitis virus）的情况比较多见（见 26.11 节）。

5. 所有的移液操作都必须使用自动移液设备（不能用嘴）。

6. 实验动物必须由专门的实验人员进行管理，为了防止对动物和实验人员的伤害，必要时可以采用麻醉药或镇静剂。

7. 根据暴露和受感染可能性大小的不同，实验室人员必须使用实验服、密封鞋、胶皮手套、口罩、护目镜、呼吸设备或其他必要的防护设备。这些防护设备在使用后也必须经过严格的净化处理并精心存放起来。同时，实验室人员也必须注意个人卫生，操作后认真洗手。实验室内严禁吃、喝、涂抹唇膏或佩戴隐形眼镜。

8. 为特别防止感染艾滋病，所有的实验室样品都应该被视作带有 HIV。因此，在处理任何种类的样品时都必须使用保护性手套。在准备样品时如果有可能产生汽、雾状物质，实验人员必须戴口罩或防护面罩。试验用的针头不得重复使用、弯曲或折断。它们应该被放置在贴有标签的容器中，这些容器再次开启之前，应该经过密封和高压灭菌处理。

以上这些安全条例应该成为所有处理潜在病原体的实验室的常规。特殊的实验室还有其他严格的规定以保证其工作环境的安全性，下面将进行深入讨论。最后还要强调，实验室的安全是其工作人员的责任。对于那些没有经过专门培训或者不愿意采取必要措施以防止感染的工作人员来说，任何实验室都是一个具有危险性的地方。

生物安全和实验室生物安全等级

用于预防临床、研究和教学实验室中感染和环境污染（泄漏）事故的安全等级必须适应实验室中处理的微生物的潜在危害性。根据实验室的安全潜能或生物安全等级（biosafety level，BSL）分成 4 类，并分别命名为 BSL-1、BSL-2、BSL-3 和 BSL-4。各种安全级别的实验室正常运行的关键在于遵循实验室的惯例——保持实验室最根本的清洁和注意实验室的安全限制。例如，不在实验室进食和饮水，每次换班或有泼洒事件发生都要清理干净。实验室人员离开时必须洗手，禁止外人入内等。

BSL-1 实验室的安全级别最低。对于感染风险较低的微生物可以在开放的实验台上进行操作，这些微生物通常不会感染一般的个体，如枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）。例如，一个不进行病原体操作的基础微生物教学实验室就是一个 BSL-1 实验室。

BSL-2 实验室是用来对具有中等感染风险的微生物进行操作的实验室。这些微生物只有在意外摄入、经皮下注射或通过气雾暴露到黏液表面才会引发感染。对于像大肠杆菌或酿脓链球菌之类的微生物需要在 BSL-2 或更高安全级别的实验室进行操作。实验操作可以在高级实验台上进行，但是需要有适当的保护措施，如脸和眼的防护罩、手套、实验服或长袍（屏障保护设备）。大多数研究、临床和教学实验室属于 BSL-2 实验室。

BSL-3 实验室是用来对具有潜在的高感染风险的病原体，尤其是气雾等漂浮物，进行操作的实验室。例如，如果实验操作人员需要处理空气来源的具有极端感染风险的病原体如引起结核病的结核分枝杆菌时，实验室要配备负压室和防止病原体泄漏的空气过滤器等专用设备。实验操作不能在开放的实验台上进行，必须在生物防护橱中进行（图

20.4)，在某些特殊情况下有些可以在 BSL-2 实验室操作的微生物必须在 BSL-3 实验室进行操作。例如，葡萄球菌属可以在 BSL-2 实验室进行接种和培养，但是当菌体大量生长，尤其是离心后的菌体必须在 BSL-3 实验室进行操作。特殊的研究和教学机构通常配有 BSL-3 实验室。

BSL-4 实验室是用来处理对人的生命具有威胁的病原体的安全级别最高的实验室。这些病原体很容易通过气雾等漂浮物进行传播，并且没有合适的免疫和治疗方法。在 BSL-4 实验室对微生物完全分离时必须具有一些物理防护装备。例如，在封闭的生物安全橱中戴手套进行操作或穿上带有供气系统的加压全身防护服（图 24.9)。有些病原体必须在 BSL-4 实验室进行操作，如出血热病毒 [拉沙热（Lassa)、马尔堡（Marburg)、埃博拉病毒（Ebola)，见 25.11 节]、天花病毒（smallpox)（天花，见 25.12 节）和抗药性结核分枝杆菌（见 26.5 节)。BSL-4 实验室只设在特殊的高危性病原体研发机构。

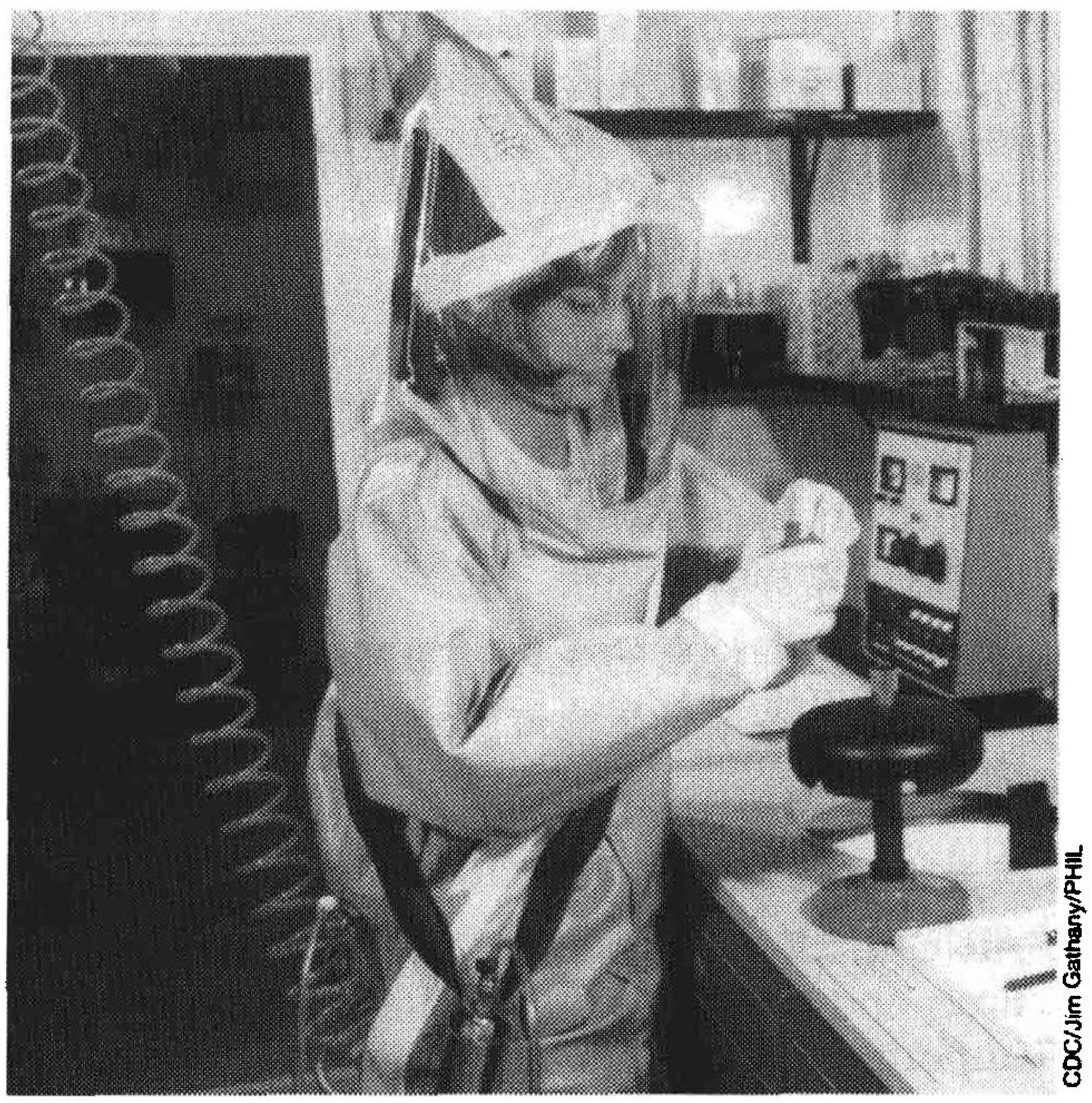


图 24.9 工人在 BSL-4（生物安全等级 4）实验室中。BSL-4 具有最高级别的生物控制，给予工作者最大限度的保护和病原体防护。工人在有外界供换气系统的全封闭实验服中工作，可以防止实验室任何物质进入，实验室中的所有的实验材料都要经过高压灭菌或化学剂净化。

概念检查

临床实验室的安全要求有效的培训、周密的计划，严格预防实验室工作人员感染病原体。实验材料，如活体培养物、接种的培养基、接种针和患者样本等，为安全起见处理时必须格外谨慎。

◆ 预防血源性病原体在实验室人员中传播的主要措施是什么？

◆ 引起实验室感染的主要原因是什么？

◆ 确定 BSL 安全实验室的基本特征是什么，包括 BSL-1～BSL-4。

Ⅱ 免疫学和临床诊断方法

在临床、基准和研究实验室，免疫测定被广泛用于检测特定的病原体或其产物。当无法培养出病原微生物时，也常用免疫检测确定感染。当没有特定病原体的例行培养方法或例行培养方法很难操作时，免疫检测是一种相对简单有效的病原体鉴定方法。比如，多数病毒感染，包括人免疫缺陷病毒 HIV 感染。

24.5 传染病的免疫测定

病原体的特异性抗体可以用来在体外检测感染性疾病。某些情况下，抗体和分子免疫应答表明患者已经受到病原体的感染。在另外一些情况下，抗体可以用来在体外鉴定病原体。

先天免疫

在第 22 章中，我们已经讨论了免疫应答。图 24.10 对免疫的主要方式已进行了总结。机体对病原菌的应答分 3 个阶段。对于机体从未接触过的病原菌来说，机体必须首先识别它，这个阶段常涉及一系列吞噬细胞（见 22.1 节）。在吞噬细胞表面有一组专门用于识别一种或多种重复的大分子物质的受体，如细胞壁上重复的糖链（见 22.2 节）。许多类型或种类的病原体中的大分子物质都可以被吞噬细胞识别而激活吞噬细胞，活化的吞噬细胞可以吞噬并破坏病原体，这个过程叫做吞噬作用（phagocytosis）。吞噬细胞识别并破坏病原体的过程叫做先天免疫（innate immunity）或非特异性免疫（nonspecific immunity），这是抵抗病原体入侵的基础。

抗原特异性免疫和抗体

在免疫应答的第二阶段，吞噬细胞呈递病原菌抗原（antigen）（由被破坏的病原菌而来的蛋白质）给抗原特异性淋巴细胞，T 细胞（见 22.1 节和图 24.10）。一些 T 细胞如 T_H（T helper），不直接作用于病原体，而是运送和刺激（帮助）另一组细胞，T_H2 细胞是一种特殊的 T_H 细胞，它可以激活其他抗原特异性细胞——B 细胞。然后 B 细胞应答产生可溶的抗原特异性结合蛋白质，称为抗体（antibody）（见 22.9 节和 22.10 节，图 24.10）。初次抗体应答（primary antibody response）一般出现在 5 天以内，但在几个星期内，抗体量并不能达到高峰。抗体蛋白因为是抗原特异性的，只能识别来自于特定病原体的特定抗原。

特异性抗体只能与靶细胞表面的抗原相互作用，但并不能杀死靶细胞。统称为补体的一组蛋白质（见 22.11 节），可以和结合有病原菌的抗体结合，将结合有抗体的菌体细胞溶解。补体-抗体系统只对结合有抗体的菌体细胞有作用。例如，针对沙门氏菌属细胞表面蛋白质的特异性抗体，只与沙门氏菌属作用：补体导致抗体激活的沙门氏菌属

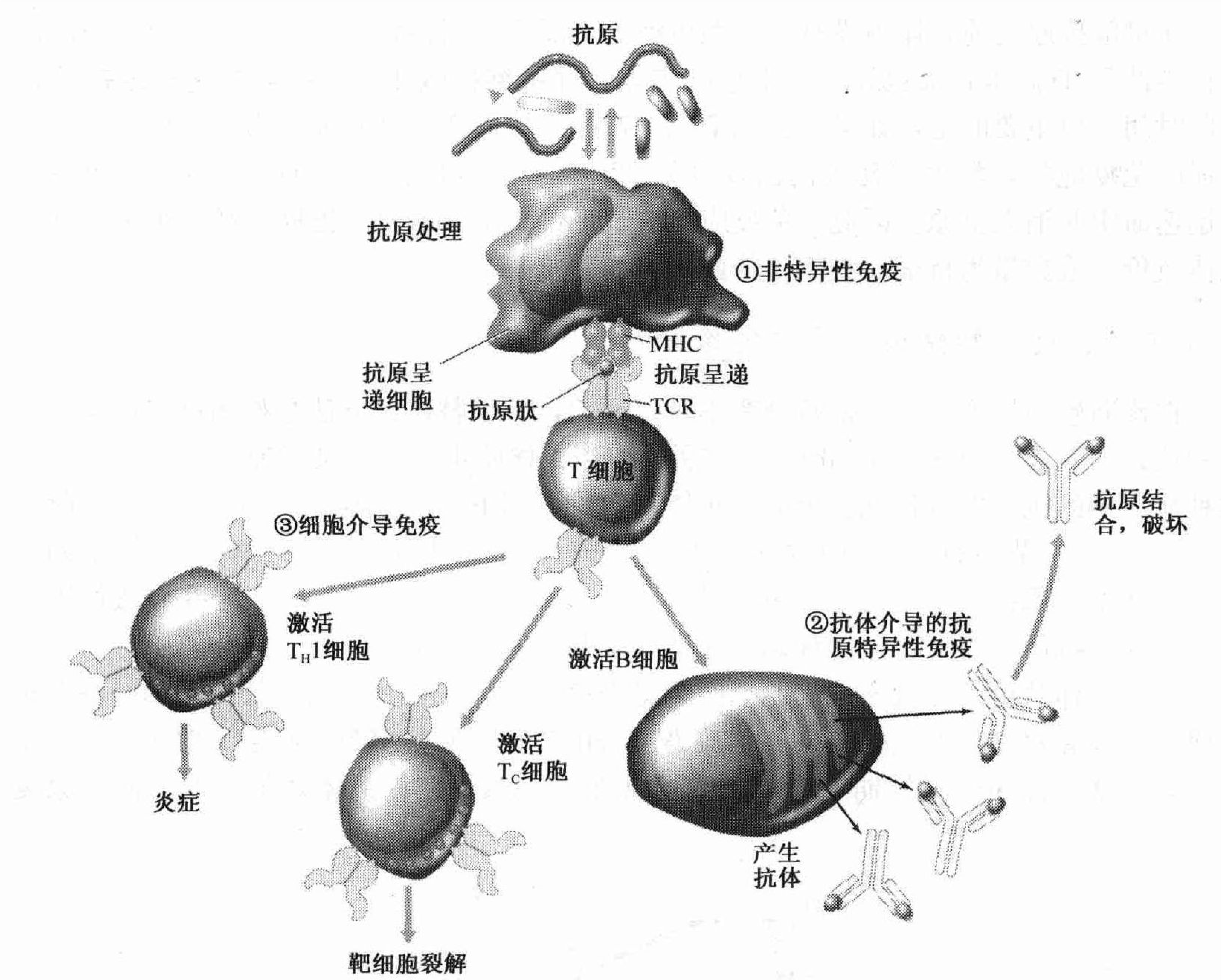


图 24.10 免疫应答。病原体刺激①先天免疫，由非特异性吞噬细胞介导，抗原特异性免疫，特异性免疫识别特异性病原体抗原，由②抗原激活抗体或③抗原激活 T 细胞，包括炎症 T 细胞（T_H1）和细胞毒性 T 细胞（T_C）介导。

细胞溶解，但对非抗体敏感的大肠杆菌却没有作用。因此，正是由于产生特异性抗体，免疫应答是针对单一抗原的特异性应答；但可以通过非特异机制介导，如补体。

细胞介导免疫和免疫记忆

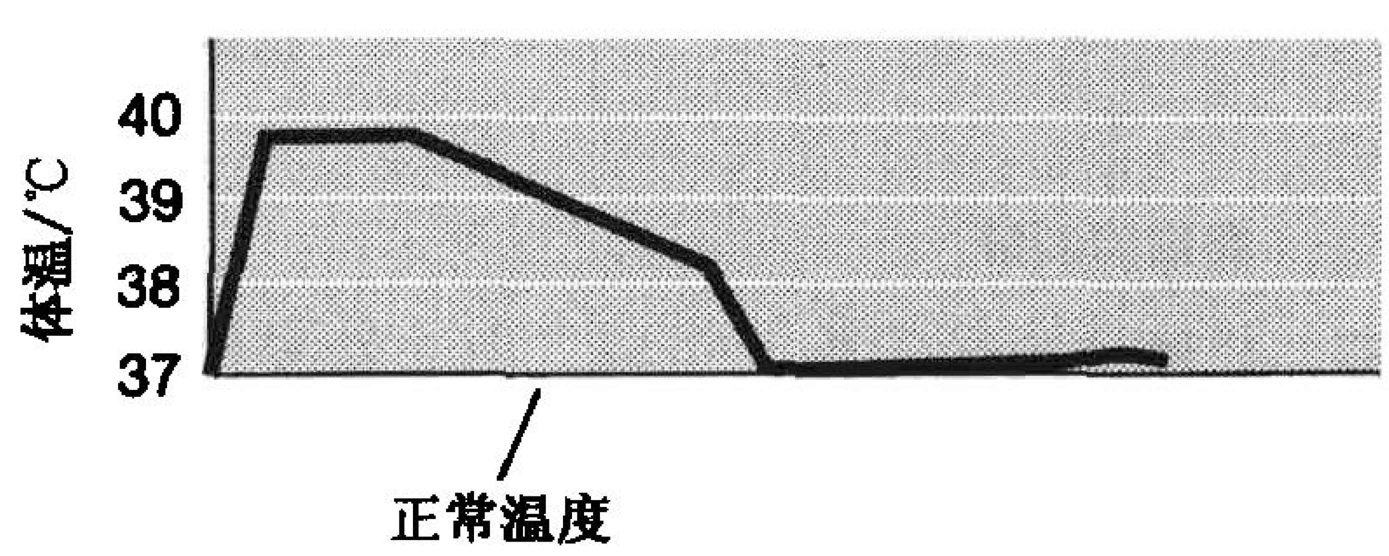
在许多情况下，抗体介导的免疫不能有效地控制感染的蔓延。有些感染性因子寄生在细胞内，例如，动物病毒利用宿主的细胞系统进行复制，因此，它们生命周期的大部分时间是在宿主细胞内度过的（见 9.12 节）；同样，引起结核病的细菌结核分枝杆菌主要寄生在吞噬细胞中（见 22.2 节和 26.5 节）。由于抗体主要识别血液中或黏膜细胞表面的游离病原，所以被感染的宿主细胞是通过其他途径被识别和破坏的。通常包括细胞间的相互作用，叫做细胞介导的免疫（cell-mediated immunity）。幸运的是，细胞内寄生菌总会在被感染的细胞表面产生特殊抗原。抗原特异性 T_H1 细胞是 T_H 细胞的一个类型，可以吸引并激活吞噬细胞，如巨噬细胞和嗜中性粒细胞，扩大免疫应答，限制感染蔓延（见 22.8 节）。此外，胞内病原体产生的抗原会在被感染细胞的表面依次呈现。细胞毒性 T 细胞（T_C）识别这种抗原并分泌细胞溶解蛋白质，叫做穿孔素（perforin），直接作用被感染的靶细胞，并将其破坏（见 22.7 节和图 24.10）。

在接触抗原之前，体内没有特异性免疫力，而第一次接触抗原后，就会产生一定量的特异性T细胞和B细胞及一定水平的抗体，并可维持数年，使特异性免疫维持较长一段时间。更重要的是，如果再次感染同一抗原，抗体产生细胞大量出现，可迅速产生很强的免疫应答，峰值在几天内出现（见22.10节），再次应答（secondary response）可迅速命中并消灭抗原。因此，免疫应答有记忆性（memory）。免疫记忆以快速上升的抗体效价，或数量为特征，我们可依此来检测感染。

抗体效价、皮试和感染性疾病的诊断

在诊断感染性疾病时，常常分离不到病原菌，一种替代的方法是检测针对可疑病原菌的抗体的效价（titer）（数量）。如前所述，当人体感染某种可疑病原菌时，体内针对这种病原菌的抗体的效价就会上升。抗体的效价可用下列反应测出，如沉淀反应、凝集反应或在24.7节～24.12节中讨论的其他方法。一般的方法是制成患者血清的系列稀释液，找出抗原抗体出现可见反应的最大稀释度（见24.11节）。由于这些方法都需要用患者含有抗体的血清，因此统称为血清学实验（serological test）。

单一抗体效价的测量不能表明活跃的感染存在，因为在感染后很长时间内，许多抗体将保持较高水平。要确定一种急性感染是否由某种病原菌引起，必须证明患者血清中抗体效价从急性期到康复期上升才行。通常在急性感染期，抗体效价较低，而在康复



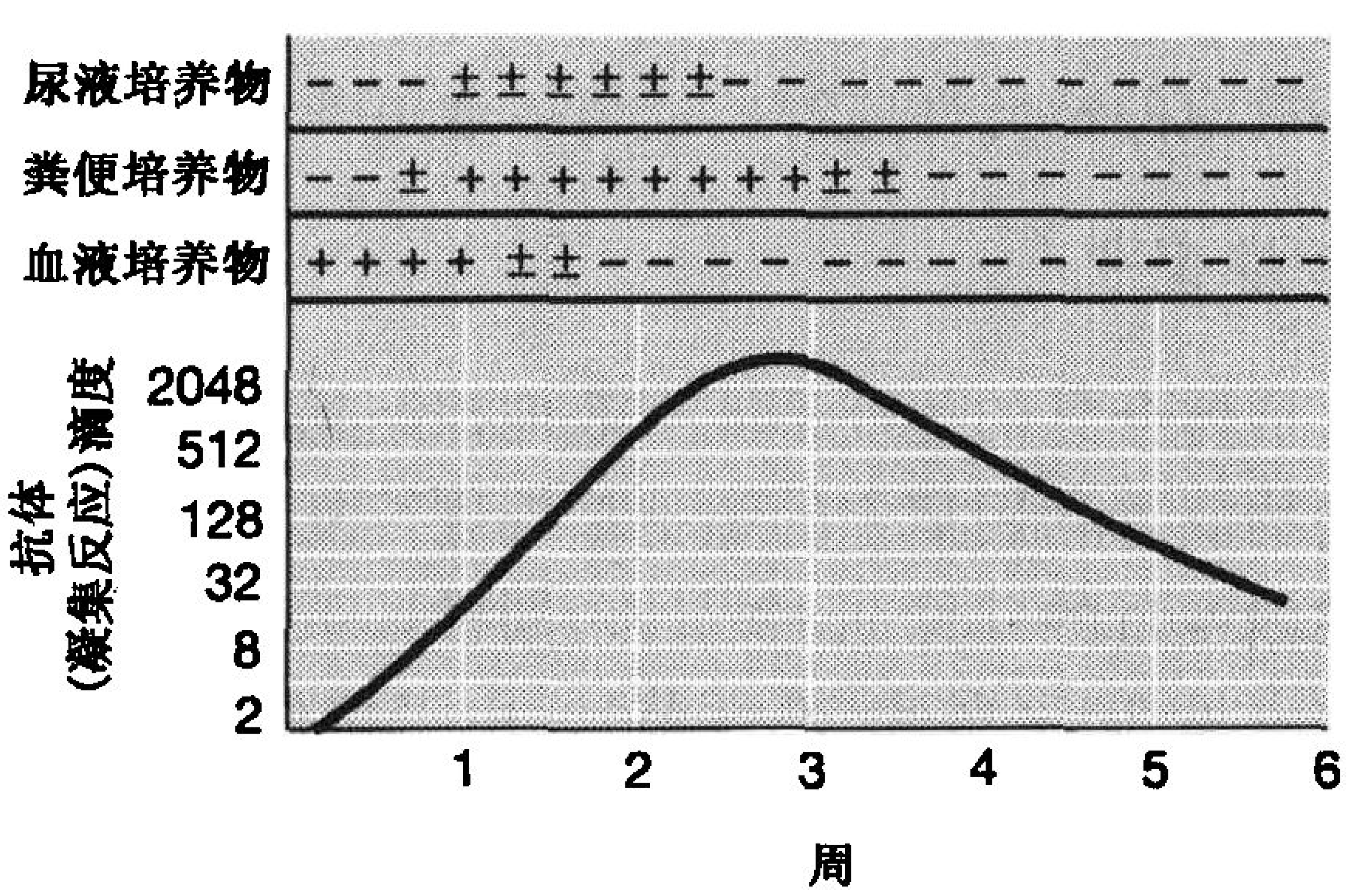


图24.11 未经治疗的典型伤寒患者的感染过程。体温的变化表示临床症状情况，抗体效价的测量是用引起试验菌株伤寒杆菌凝集的抗体最大稀释度来表示。从血液、粪便和尿的定期培养物中测定活菌量。注意，当抗体效价升高时，病原菌从血液中清除了。从粪便和尿中清除需要更长的时间。当抗体效价上升时，体温逐渐趋于正常。图中给出的数据不是某个患者的情况，而是大量患者情况的总和平均数。

期，抗体量升高（图 24.11）。这种抗体效价的上升正表明疾病由此病原菌引起。然而，在一些情况下，仅存的一些抗体对诊断疾病就足够了，这是因为在机体内很少发现这种病原菌，现存的抗体就足以证明机体已经或即将被这种病原菌感染。与此相关的一个例子是获得性免疫缺陷综合征（AIDS）（见 26.14 节）。下面我们将在 24.11 节和 24.12 节中讨论人类免疫缺陷病毒（HIV）抗体水平的测定方法。不幸的是，不是所有的感染都导致出现系统免疫。如果病原菌只在局部繁殖，将不引起免疫应答，即使病原菌在感染部位大量繁殖，也不引起抗体效价上升。一个很好的例子是淋病，引起淋病的淋病奈瑟氏球菌感染后，不引起系统性免疫应答，所以治愈后再次感染是正常的（见 24.1 节和 26.12 节）。

在一些情况下，血清中出现抗体是因注射疫苗。实际上，注射疫苗后检测抗体的上升是一种有效的测定疫苗接种效果的方法。

皮试是另一种检测是否接触病原体的方法。最常见的皮试是结核菌素测试，它是在皮下注射可溶的结核分枝杆菌细胞抽提物。如果在 48h 内在注射部位有炎症反应发生，则表明现在或以前受到结核分枝杆菌的感染。这种测试用于鉴定由病原体特异性 T_H1 细胞引起的迟发型过敏反应（见 22.15 节）。皮试可诊断肺结核、麻风病（见 26.5 节）、多种真菌病（见 27.8 节）和其他一些抗体应答弱或无应答的疾病。病原体的常用免疫诊断检测如表 24.5 所示。

表 24.5 感染体诊断的免疫程序

病源/疾病	抗原	程序[a]
HIV（AIDS）	人类免疫缺陷病毒（HIV）	ELISA
布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）（莱姆病）	鞭毛蛋白	ELISA
	表面蛋白质	免疫印迹 杀菌力试验（见 27.4 节）
布鲁氏菌属（*Brucella*）（布鲁菌病）	细胞壁抗原	凝集试验
白色假丝酵母（*Candida albicans*）（酵母感染）	真菌蛋白质的可溶物	皮肤测试
白喉棒状杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）（白喉）	毒素	皮肤测试
流感病毒（Influenza virus）（流感）	流感病毒悬浊液 有流感病毒的鼻咽部细胞	补体测定 免疫荧光染色法
麻风分枝杆菌（*Mycobacterium leprae*）（麻风病）	麻风菌素（菌体蛋白质的可溶物）	皮肤测试
结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）（结核病）	结核菌素（纯化的蛋白质衍生物，PPD）	皮肤测试
脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）（脑膜炎）	荚膜多糖	被动血凝反应［脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）吸附红细胞］
卡氏肺囊虫（*Pneumocystis carinii*）（肺囊肿）	肺囊虫（*Pneumocystis carinii*）细胞	免疫荧光染色法
立克次氏体属（*Rickettsia*）（Q 热，斑疹伤寒，落基山斑疹热）	被杀死的立克次氏体	补体测定或细胞凝集试验，ELISA
沙门氏菌属（*Salmonella*）（肠胃炎）	O 和 H 抗原	凝集试验，ELISA

续表

病源/疾病	抗原	程序[a]
链球菌属（*Streptococcus*）（类群 A）（脓毒性咽喉炎，猩红热）	链球菌属（*Streptococcus*）溶血素 O（外毒素），DNase（胞外蛋白质）	溶血中和作用，酶中和作用
梅毒螺旋体（*Treponema pallidum*）（梅毒）	心磷脂-卵磷脂-胆固醇	絮凝（VDRL 试验）
霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）（霍乱）	O 抗原	凝集试验，杀菌力试验（补体存在的条件下），ELISA

a. 使用免疫荧光标记的抗体检测一个样品中特定的病原体。用 T_H1 介导的迟发性超敏反应皮肤试验检测白色假丝酵母、结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌。白喉杆菌的锡克试验和毒素中和试验检测血清抗体。其他试验者使用血清级的抗体。

概念检查

免疫应答是机体受到感染的自然反应。特异性免疫应答，尤其是抗体效价和皮试可以提供患者的感染病史、现症或治愈的信息。

◆ 描述从感染的急性期到治愈期特异性抗体效价的变化情况。

◆ 描述 TB 皮试的方法、期限和理论。这种测试是检查什么因素引起的免疫应答?

24.6 多克隆抗体和单克隆抗体

免疫应答的结果通常是产生针对无数抗原决定簇的免疫球蛋白分子（Ig）（见 22.5 节、22.9 节和 22.10 节）。其中针对每个特定抗原决定簇的 Ig 只有少数一部分。抗血清是多种抗体的混合物，因此称为多克隆抗血清。多克隆抗血清中包含的抗体能够给机体提供足够的免疫保护，但是这些抗体是针对不同抗原决定簇的。由于抗血清中的抗体是由动物个体在特定时间免疫应答所产生抗体的总和，因此，完全相同的抗血清是不可再生的。

然而，每个 Ig 都是由单一的 B 细胞产生的（见 22.10 节），体外克隆的 B 细胞可以提供无限量的单一特异性免疫球蛋白。由单一的 B 细胞克隆产生的抗体称为单克隆抗体（monoclonal antibody）。存活周期长的 B 细胞可以冷冻保存，并可以重新活化产生可再生的特异性抗体。因此，在许多免疫分析应用方面单克隆抗体技术代替了标准的多克隆技术。表 24.6 比较了多克隆抗体（polyclonal antibody）与单克隆抗体的特性。

表 24.6 单克隆抗体和多克隆抗体产品的特征

多抗	单抗
含有多个识别一个抗原的多个抗原决定簇的抗体	含有单一识别单一的抗原决定簇的抗体
含有多种抗体（如 IgG、IgM 等）	产生单一的抗体
只有使用高度纯化的抗原才产生特异抗体	使用不纯的抗原可以产生特异抗体
难以再生和标准化	高度的再生性

单克隆抗体和杂交瘤

细胞培养物（体外）中产生抗体的 B 淋巴细胞通常在几个星期后死亡。因此，通

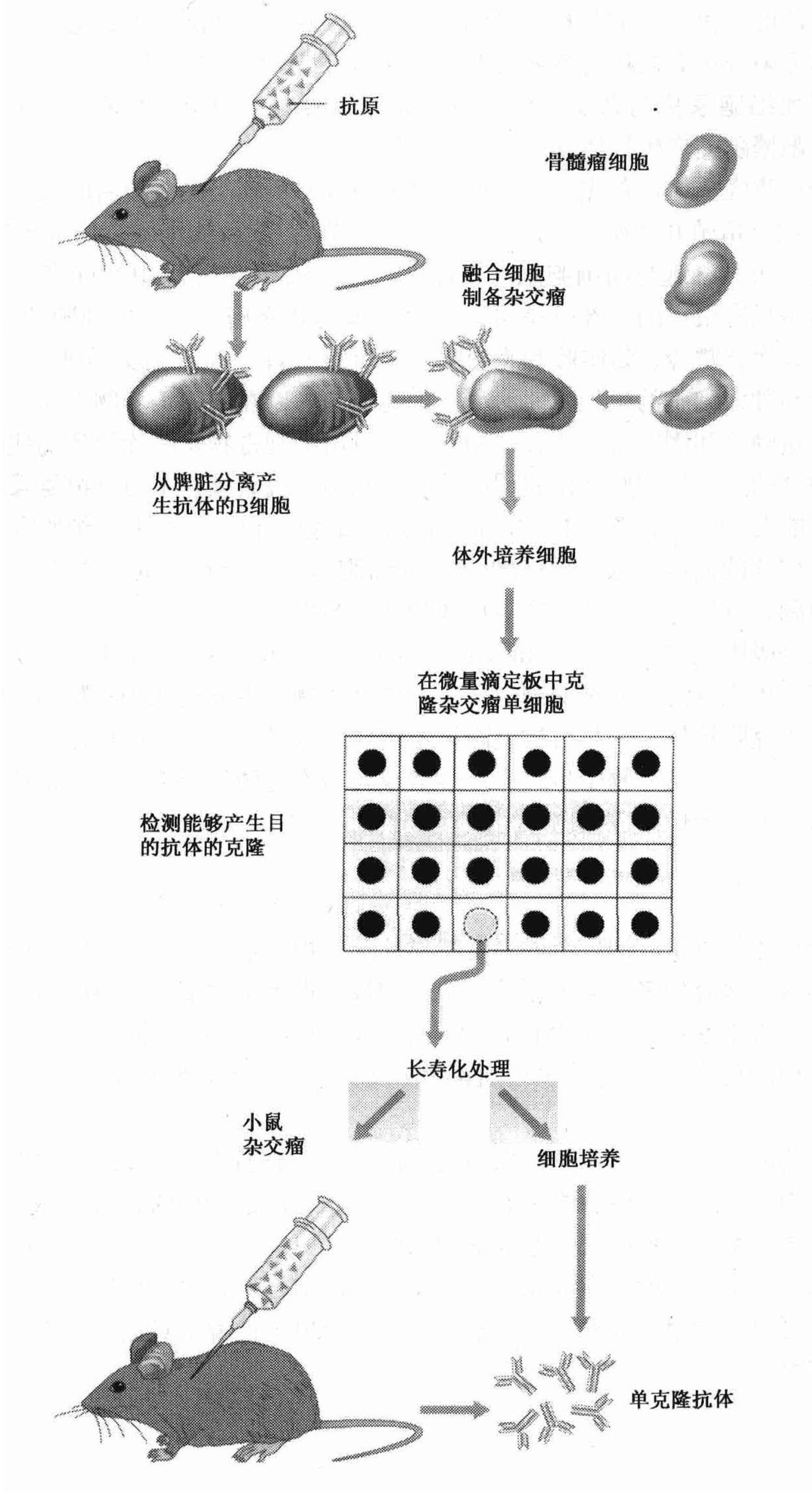


图 24.12　杂交瘤技术和单克隆抗体产品。杂交瘤可以无限地培养或者像肿瘤一样在动物体内繁殖。还可以作为冷冻的肿瘤细胞保存，需要的时候可以在组织培养物或合适的动物宿主中重建。

常将产生抗体的B淋巴细胞与称为骨髓瘤（myeloma）的B肿瘤细胞融合。这些肿瘤细胞通常可以无限分裂而被称为不死细胞系。将来自于B淋巴细胞和B肿瘤细胞融合的细胞系的不死细胞系称为杂交瘤（hybridoma）。杂交瘤细胞系具有融合双方的特性，可在体外无限繁殖并产生抗体（图24.12）。

要生产单克隆抗体，首先要用一种感兴趣的抗原免疫小鼠。随后的几个星期，抗原特异性的B细胞增殖并开始产生抗体（见22.10节）。然后从小鼠体内取出富含B淋巴细胞的脾脏，使B细胞与瘤细胞融合（图24.12）。尽管培养物中的许多细胞融合并开始生长，但是只有很小的一部分是可以产生抗体的杂交瘤。在体外细胞培养物（HAT介质）中加入次黄嘌呤、氨喋呤和胸腺嘧啶脱氧核苷首先筛选杂交瘤细胞。HAT停止了没有融合的肿瘤细胞的生长，因为尽管肿瘤细胞可以在细胞培养物中无限生长，但是不能利用次黄嘌呤和胸腺脱氧核苷代谢物来通过由细胞毒物氨喋呤导致的代谢阻断；相反，已经融合的杂交瘤细胞可以利用次黄嘌呤和胸腺脱氧核苷来通过由氨喋呤产生的代谢阻断，且能在HAT培养基中正常生长；这些细胞得到了来自于B细胞利用次黄嘌呤和胸腺脱氧核苷的遗传信息。没有融合的B细胞因为不能在培养基中生长而在几天后死亡。细胞融合以后，必须鉴定产生抗体的杂交瘤克隆。

酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immuno sorbent assay，ELISA）（见24.10节）可以鉴定产生单克隆抗体的杂交瘤。从一个典型的融合中分离几种独特的克隆，每个克隆产生一种单克隆抗体。一旦目标克隆被鉴定，那么可使其像生产抗体的肿瘤一样在体内生长，或者在细胞培养物中生长。从肿瘤或者培养物的悬浮物中收获抗体。杂交瘤细胞可以无限生长或者像冷冻细胞一样保存。

分析和治疗方面的应用

单克隆抗体提供了应用广泛的高度特异性的生物制剂。单抗在临床分析测试、细菌免疫分类、鉴定含有外来表面抗原的细胞（如被病毒感染的细胞）中应用广泛。单抗也被用于遗传工程来鉴定或测量基因产品的水平，而这些产品通常用其他的方法不可检测，单抗在增加已有临床测试包括血液和组织类型的特异性方面也显示了极大的优越性。

由于单抗的特异性，可用单抗来检测和治疗人类的癌症。恶性细胞的大量表面抗原在正常细胞中不表达。这些肿瘤抗原（tumor antigen）是独特的肿瘤细胞产生的特异性的细胞蛋白质。由特异性的靶标恶性细胞的肿瘤抗原制备的单抗，可以直接特异性地向恶性细胞输送毒素。目前正在临床测试与毒素共价结合的肿瘤特异性单抗。或许单抗疗法的特异性可以极大地提高癌症的化学疗法，因为单抗代替了对正常细胞一样造成伤害的化学和放射疗法。

概念检查

研究和临床应用中使用多抗和单抗。杂交瘤技术为大范围的临床分析和研究提供了可再生的、单一特异性的抗体。

◆ 多抗怎样识别不同的抗原决定簇？

◆ 与多抗相比，单抗有什么优点？多抗有什么优点？

24.7 体外抗原-抗体反应：血清学

体外抗原-抗体反应称为血清学（serology)。血清反应是所有免疫测试分析的基础。抗原-抗体反应的原则在于抗原上抗原决定簇与抗体分子上可变区的特异性相互作用。

各种不同的用于鉴定抗原的血清学测试都依赖于抗原的性质和选择的反应条件（表24.7)。

表24.7 抗原-抗体反应的类型

抗原的定位	需要的补助因素	得到的反应
可溶性的	没有	沉淀反应（见24.7节）
细胞或惰性颗粒	没有	凝集反应（见24.8节）
鞭毛	没有	固定化或凝集反应（见24.8节）
细菌细胞	补体	溶解反应（见22.11节）
细菌细胞	补体	致死反应（见22.11节）
红细胞	补体	溶血反应（见22.11节）
毒素	没有	中和作用（见24.7节）
病毒	没有	中和作用（见24.7节）
细菌细胞	嗜菌细胞，补体	嗜菌作用（调理作用，见22.11节）

特异性和敏感性

基于分析目的的血清学测试的有效性在于测试的特异性和敏感性。特异性（specificity）就是抗体识别单一抗原的能力。最佳的特异性说明抗体对抗原是特异性的，不会与其他的抗原产生交叉反应，因此，不会产生假阳性结果。特异性必须由阳性和阴性对照抗原的一系列试验来详细说明。每次使用测试时，测试的特异性必须由试验测定和检验。

敏感性（sensitivity）可以决定被检测的抗原的最低量。最高水平的敏感性要求测试中的抗体可以识别单一的抗原分子。高度敏感性防止了假阴性反应。一些常用免疫测试的灵敏度如表24.8所示，这种灵敏度都是基于检测抗原所需抗体的量。每种测试方法检测出的抗原量与使用的抗体量成比例。例如，免疫沉淀反应需要大量的抗体，只能检测0.1～1.0mg的抗原，因此，沉淀试验是敏感性最低的血清学测试；相反，酶联免疫吸附测定，或者ELISA检测（见24.10节）比沉淀抗原所需抗体少10万倍，可检测的抗原量少100万倍（0.1～1.0ng)。因此，ELISA检测是最灵敏的血清学检测之一。

中和作用

中和作用（neutralization）是指抗体有效妨碍或扭曲其相应抗原以降低或消除其生物学活性的反应。中和作用可在体内或体外发生。

表 24.8 免疫诊断检测的灵敏度

检测	灵敏度/(μg 抗体/ml)[a]
沉淀反应	
在液体中	24～160
在凝胶中（双重免疫扩散）	24～160
凝集反应	
直接	0.4
被动	0.08
放射性免疫检测（RIA）	0.0008～0.008
酶联免疫吸附测定（ELISA）	0.0008～0.008
免疫荧光	8.0

a. 在抗原存在下，产生阳性反应所需抗体的最小量。

例如，当毒素和特异性抗体结合时，就会发生特异性抗体中和微生物毒素的反应，此时毒素的活性部分被阻碍（图 24.13）。许多细菌毒素包括表 21.4 所列的大部分毒素都可以发生这种类型的中和作用。包含某种抗体的抗血清能够中和相应的毒素被称为抗毒素（antitoxin）。抗毒素疗法曾用于治疗肉类中毒、破伤风及白喉，这些疾病都是由细菌产生的外毒素引起的。

当病毒被特异性抗体结合时，也可能发生中和作用。例如，抗流感病毒的红细胞凝集素和神经氨酸酶蛋白质的抗体可以阻止病毒对宿主细胞上特异性受体的吸附。患者的血清，可用于体外中和作用检测，但不能用于常规的诊断实验室，因为中和检测需要具有生物活性的体系。

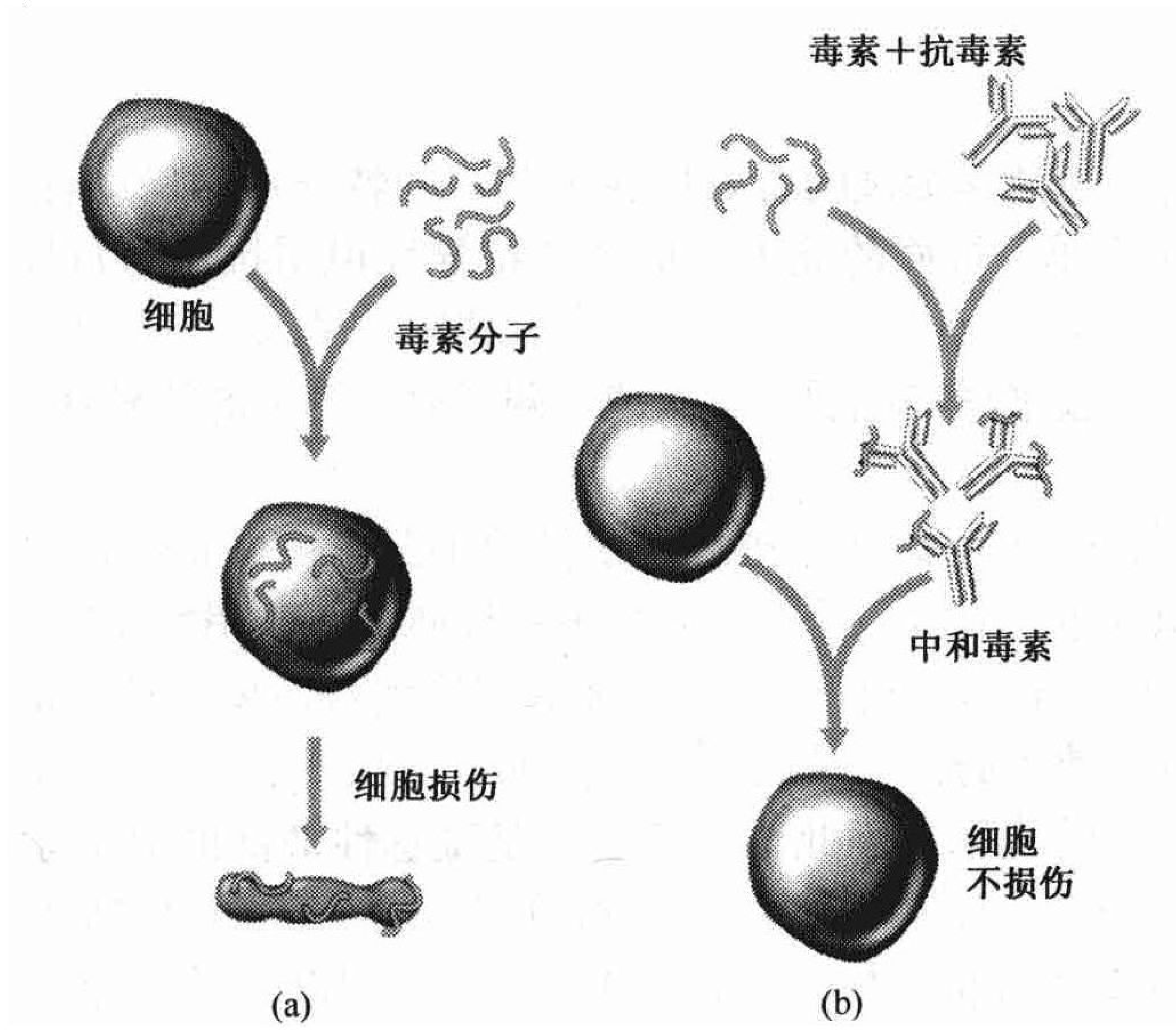


图 24.13 抗体中和外毒素。抗毒素用于治疗急性白喉（见 26.3 节）、破伤风（见 27.9 节）和肉类食品中毒病例（见 29.6 节）。(a) 未处理的毒素导致细胞破坏。(b) 抗毒素中和毒素并阻止细胞破坏。

沉淀反应

可溶性抗体与相应可溶性抗原反应形成不可溶复合物的反应称为沉淀反应（precipitation)。抗体分子一般有两个抗原结合位点（即二价），因此，每个位点可与一个单独抗原分子结合。如果抗原也含有多于一个的决定簇，抗体和抗原分子就有可能形成沉淀(图 24.14a)。因为在体外极易观察到，沉淀反应在血清检测中可提供重要信息，尤其对于抗体溶液的大量检测。只有当两个发生反应的物质比例达到最佳时，才会发生最大限度的沉淀反应。抗原或抗体中的任何一种过量均会导致小的、可溶性免疫复合物的形成。

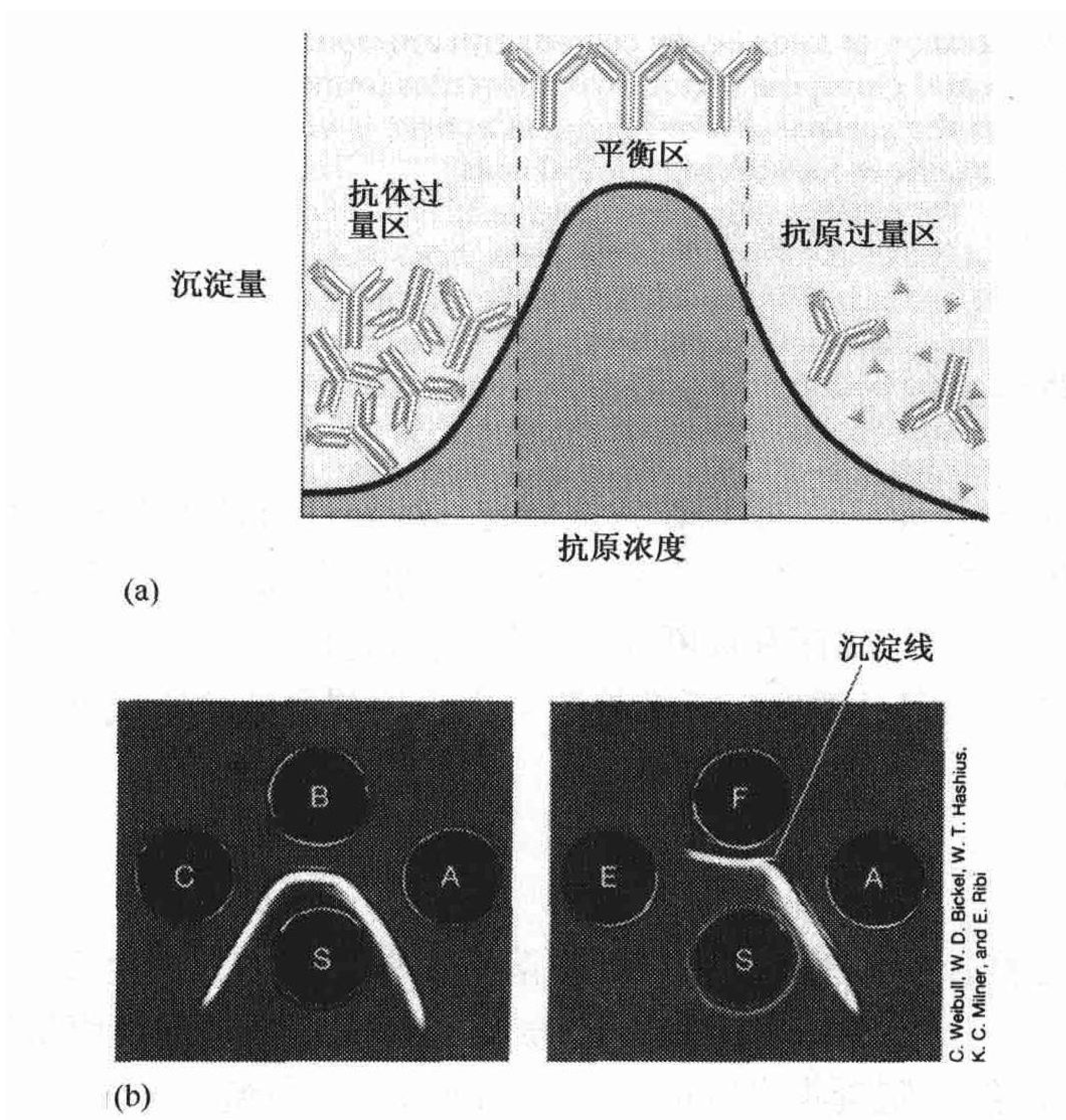


图 24.14 可溶性抗原和抗体间的沉淀反应。(a) 表明作为抗原和抗体溶液的性质，发生沉淀反应的量。(b) 在琼脂糖凝胶中，被称为免疫扩散过程。标有 S 的孔中含有奇异变形菌（*Proteus mirabilis*）细胞的抗体。标有 A、B 和 C 的小孔含有奇异变形菌（*P. mirabilis*）可溶性提取物。左边小孔可观察到特征线。右边，E 抗原不反应，A 抗原与 F 抗原发生部分特征性反应。

在琼脂糖凝胶上进行的沉淀反应称为免疫扩散试验（immunodiffusion)，用于研究特异性抗原-抗体反应。抗原抗体均可从单独的凝胶孔中向外扩散，在抗体和抗原以最适比例反应的区域出现沉淀带（图 24.14b)。这种沉淀带是反应物质所特有的；将两种抗原与一种血清置于相邻小孔中，通过观察沉淀带的形成可判断分子间的关系。例如，如果相邻两种抗原是相同的，将会形成单一的、融合的沉淀带，称为均一带；另一方面，如果相邻小孔中含有一种相同抗原，但一个孔中含有另外一种抗原，将会形成部分均一带（图 24.14b)。沉淀带的延长（表示抗血清与第二种抗原的反应）称为分支，免

疫扩散试验作为一种生物化学研究的工具，用于研究不同来源蛋白质之间的关系。

不幸的是，容易观察到的沉淀反应并不十分灵敏。特异性抗体的量对观察沉淀物是必需的（表 24.8），大多数有用的诊断检测需要纳克级的灵敏度。所以沉淀反应通常只用于研究和参考实验室。

概念检查

抗原-抗体反应需要抗体结合到抗原上。特异性和灵敏度确定了血清学检测的准确度。中和试验和沉淀反应是产生可见结果包括抗体-抗原反应的抗原结合检测的例子。

◆ 在血清学反应中，高特异性防止了假阳性反应。高灵敏性防止了假阴性反应。解释。

◆ 解释中和作用的概念。

◆ 沉淀反应中什么是抗原抗体最小需要量？

24.8 凝集反应

凝集反应（agglutination）是颗粒状抗原与其特异性抗体混合时产生可见团块的反应。尽管不如其他一些血清学检测灵敏，但凝集试验比沉淀试验要灵敏约 100 倍（表 24.8）。凝集试验广泛用于临床和诊断实验室，因为它们简单易行、特异性强、价格低廉、反应迅速且具有一定灵敏度。标准检测可用于检测血液抗原成分和许多病原体及病原体产物的鉴定。

直接凝集试验

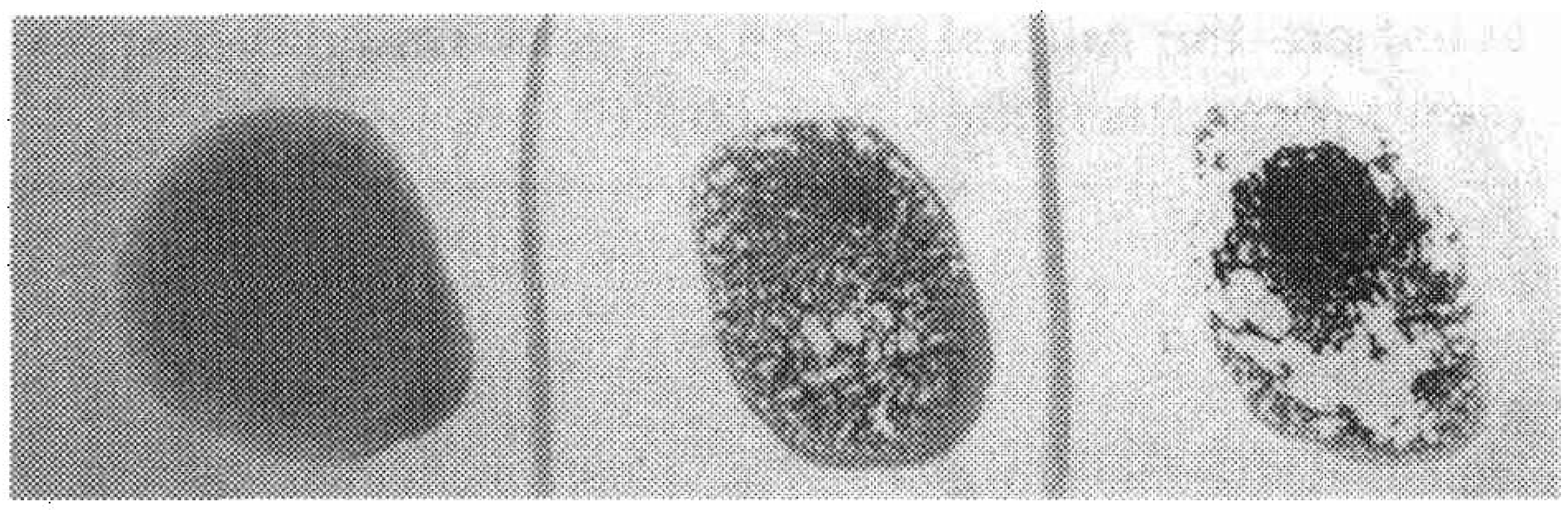
可溶性抗体与整合在细胞表面或其他不溶性颗粒上的抗原发生反应产生团块，称为直接凝集反应（direct agglutination）。直接凝集反应用于红细胞表面抗原的分类（红细胞）。红细胞凝集即红细胞凝集（hemagglutination），是血型分类的基础。

红细胞具有多种细胞表面抗原，由于红细胞上存在的抗原的不同，个体差异性很大。人类主要的红细胞抗原称为 A、B 和 D（也被称为 Rh）。

A 和 B 抗原及抗体是 ABO 血型检测的基础。当一滴血在载玻片上与抗人类红细胞 A 或 B 抗原的抗血清混合，对某种红细胞表面抗原具有特异性的抗体引起红细胞可见的凝集（图 24.15）。抗血清从经自然或人工方法免疫过 A 或 B 抗原的志愿者处获得。

对于 A、B 和 O 血型，个体表达共显性 A、B 等位基因作为下列抗原表现型：A、B、AB（一个等位基因表达 A 抗原，另一个等位基因表达 B 抗原）或 O（A 或 B 抗原都不存在）。另外，个体对大多数非自身血液组分抗原产生抗体，A 型个体对 B 型抗原产生抗体，而 B 型个体对 A 型抗原产生抗体；AB 型个体既没有 A 抗体也无 B 抗体；而 O 型个体既有 A 抗体也有 B 抗体（图 24.15）。抗 A 和抗 B 抗体称为天然抗体（natural antibody），因为大部分个体在对普遍存在的抗原，如肠溶细菌，应答时都可产生。

在输血之前必须进行血型检测，防止红细胞损坏，如果受体血液中的抗体与所输血液的红细胞发生反应，红细胞会被破坏，反之亦然。抗体包被的红细胞通过补体反应很



(a)

血型	占美国人口数的百分比/%	血清	
		抗A	抗B
O型	47	无凝集	无凝集
A型	42	凝集	无凝集
B型	8	无凝集	凝集
AB型	3	凝集	凝集

(b)

图 24.15　用于 ABO 血型鉴定的人类红细胞直接凝集反应。（a）左边的反应没有发生凝集。中间表现扩散凝集，表明 B 型阳性反应。右边表明强烈的 A 型凝集反应，产生了大团块凝集。（b）美国人口预期血型结果。

容易发生溶血现象（红细胞溶解），导致重症贫血。

被动凝集反应

被动凝集反应（passive agglutination）是被吸附或化学偶联到细胞或不溶性颗粒（如乳胶小珠或活性炭粒子）上的可溶性抗原或抗体的凝集。凝集反应可以通过细胞或粒子作为惰性支持物的不溶性抗原或抗体检测。被动凝集反应比直接凝集检测灵敏 5 倍（表 24.8），极大地提高了灵敏度。

用患者的抗体或抗原与互补的抗原包被或抗体包被的微球进行凝集反应是快速诊断的一个典型的方法。用特异性抗原包被的微球（0.8μm）与患者血清在载玻片上混合并温育一段时间。如果患者抗体与微球表面的抗原结合，出现乳白色可见凝集，表明发生了阳性凝集反应。通过将少量细菌菌落与抗体包被的微球混合，也用于检测细菌表面抗原。例如，商业上用蛋白 A 和凝集因子（两个分子，在金黄色葡萄球菌表面发现）的抗体包被的微球悬浮物，鉴定临床分离的金黄色葡萄球菌，特异性可达 100%。不像传统的金黄色葡萄球菌的检测依赖其生长，用微球检测来鉴定金黄色葡萄球菌只需 30s（图 24.16）。其他微球凝集检测被开发用于检测不同 β-溶血链球菌病原体，包括酿脓链球菌（Lancefield group）A、B、C、D、F 和 G，淋病奈瑟氏球菌和脑膜炎奈瑟氏球菌，流感嗜血杆菌，大肠杆菌 O157：H7，以及真菌新型隐球酵母和白色假丝酵母。

类风湿因子（rheumatoid factor）的特异性血清抗体检测广泛采用微球凝集检测，类风湿因子是一种直接对抗人体自身 Ig 的抗体，并与类风湿病相关（见 22.15 节）。用人体 Ig 包被的微球与全血液或血清混合，凝集反应与阳性及阴性反应作对照。

被动凝集反应不需要昂贵的设备或专业技能，特异性和灵敏度都非常高，另外，其

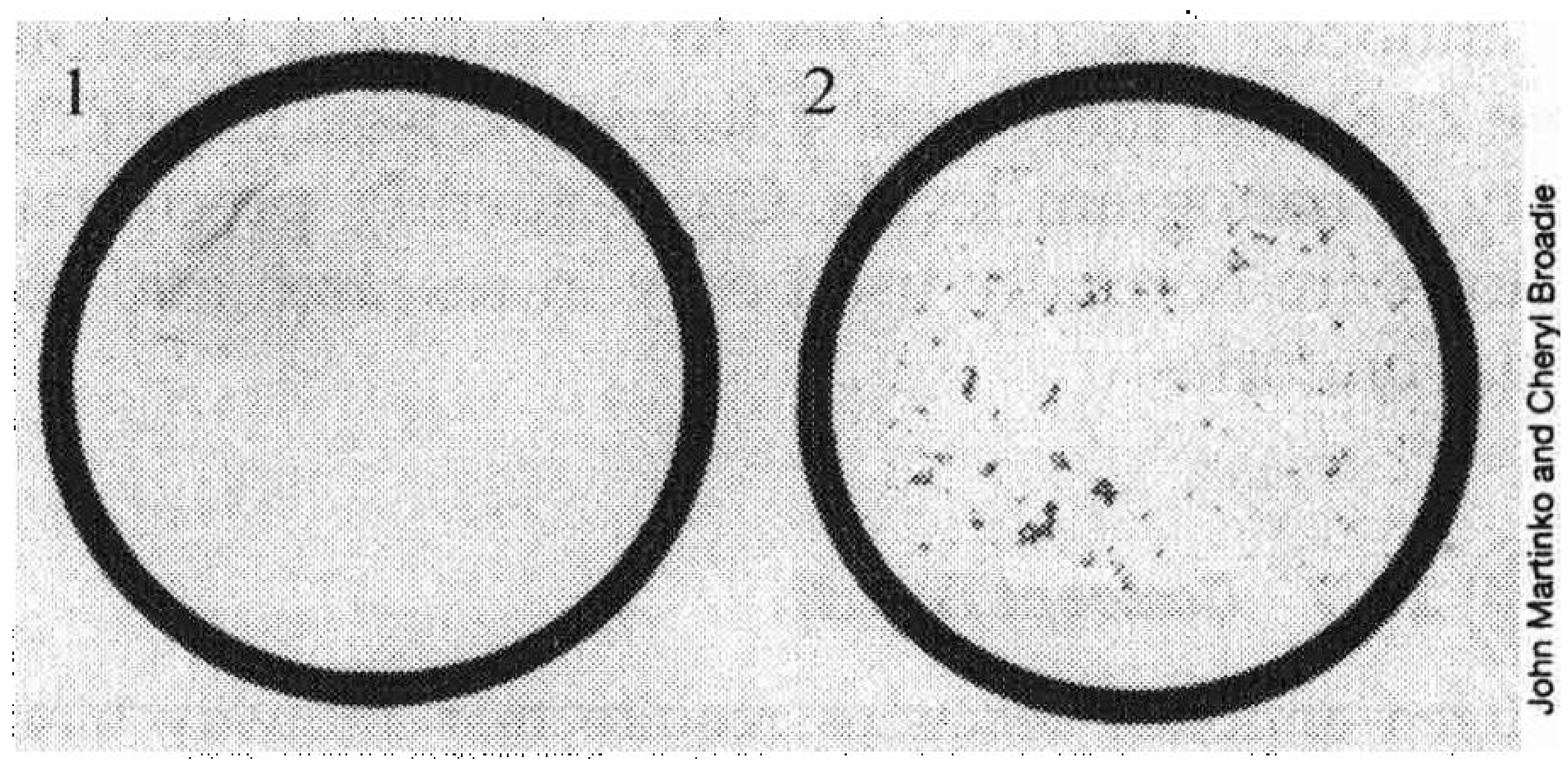


图 24.16 乳胶球凝集试验用于检测金黄色葡萄球菌。板 1 表现阴性反应。注意用 A 蛋白和凝集因子［在金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）表面发现的特有的两种抗原］的抗体包被的微球均为粉红色。板 2 表明在加入细菌菌落物质并与悬浮物混合后，出现同样的悬浮物质。明亮的红色团块表明发生了阳性凝集反应，并表明该菌落为金黄色葡萄球菌。

廉价的特点也使它适用于大规模筛选。这些检测广泛用于临床和实验室研究。

概念检查

直接凝集检测广泛用于血清型鉴定，一些被动凝集检测可用于各种病原体和病原体相关产物的鉴定。凝集检测快速、相对灵敏度高、特异性强、易于操作并且价格低廉。

◆ 区分直接和被动凝集。哪种检测更为灵敏？

◆ 凝集反应和其他免疫学方法相比有哪些优缺点？

24.9 荧光抗体

抗体能够用荧光染料进行化学修饰，这些修饰抗体可以用来检测完整细胞上的抗原。荧光抗体（fluorescent antibody）广泛地应用于临床诊断和实验研究。

荧光方法

抗体能被荧光染料共价修饰，这类荧光化合物，如罗丹明 B 发红色荧光，或异硫基氰酸荧光素发黄绿荧光等。这种修饰并不改变抗体的特异性，但是能够通过荧光显微镜来检测结合到细胞或阻止表面抗原的抗体（图 24.17）。当用特殊波长的光激发时，细胞结合的荧光抗体能够发出很亮的荧光，颜色通常是橙红色或黄绿色，这主要是根据使用染料的种类。荧光抗体广泛应用于微生物诊断，这是因为这个方法可以对患者直接进行微生物检测（原位），而不需要分离及组织培养（见下文）。荧光抗体技术在微生物生态学研究中也非常有用，利用这个方法可以直接观察并检测微生物细胞而不需要分离和培养（见 18.3 节）。

有两种不同的荧光染色法，即直接法和间接法。直接法中，结合于表面抗原的抗体是与荧光染料共价结合的。在间接法中，与细胞表面结合的非荧光抗体的存在是通过使用抗这种非荧光抗体的荧光抗体来检测的（图 24.18）。

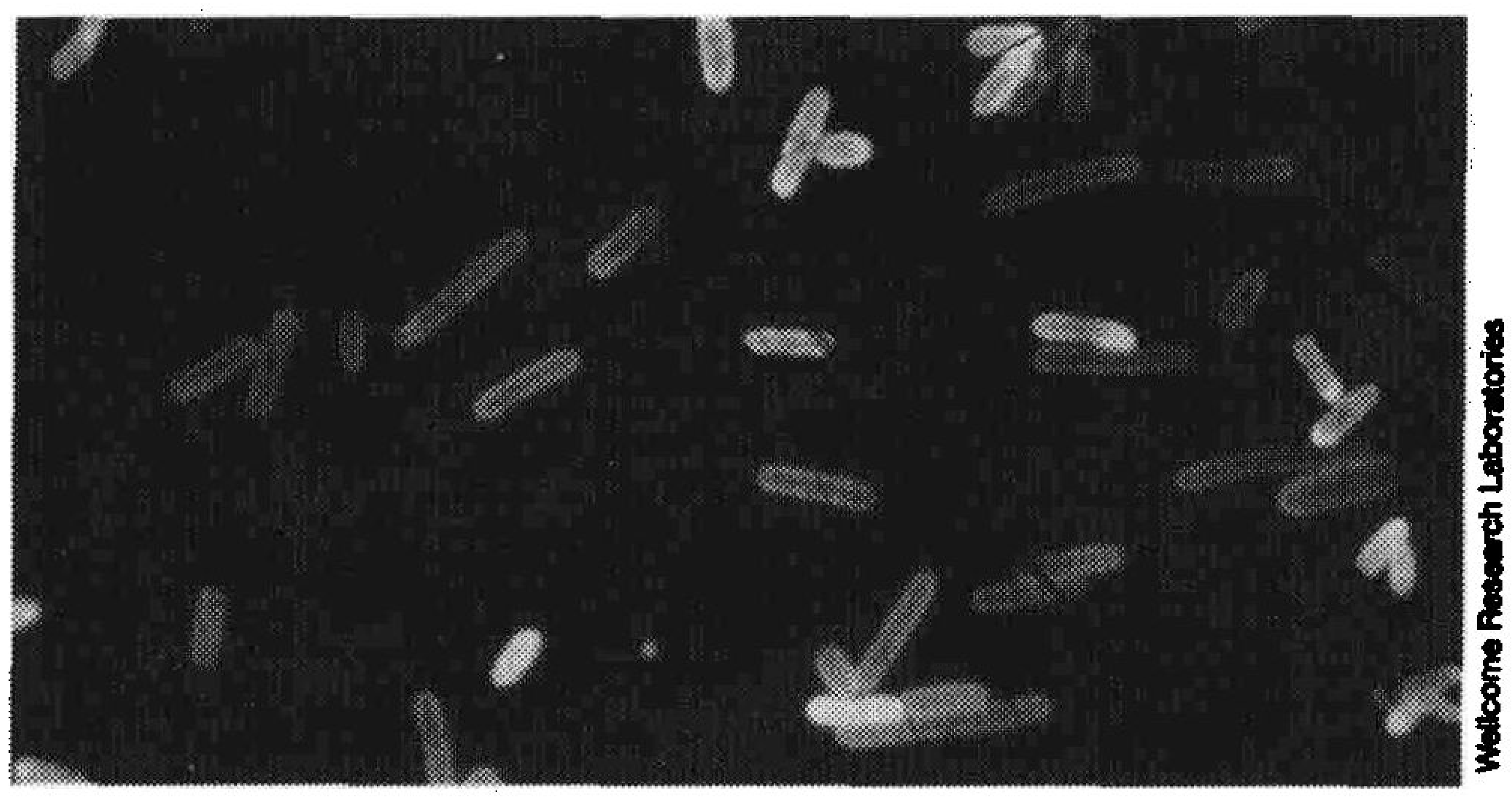


图 24.17　荧光抗体反应。用异硫基氰酸荧光素结合抗体染色的败毒梭菌（*Clostridium septicum*）细胞，显黄绿色荧光。肖氏梭菌（*Clostridium chauvoei*）用结合罗丹明 B 的抗体染色，显橙红色荧光。

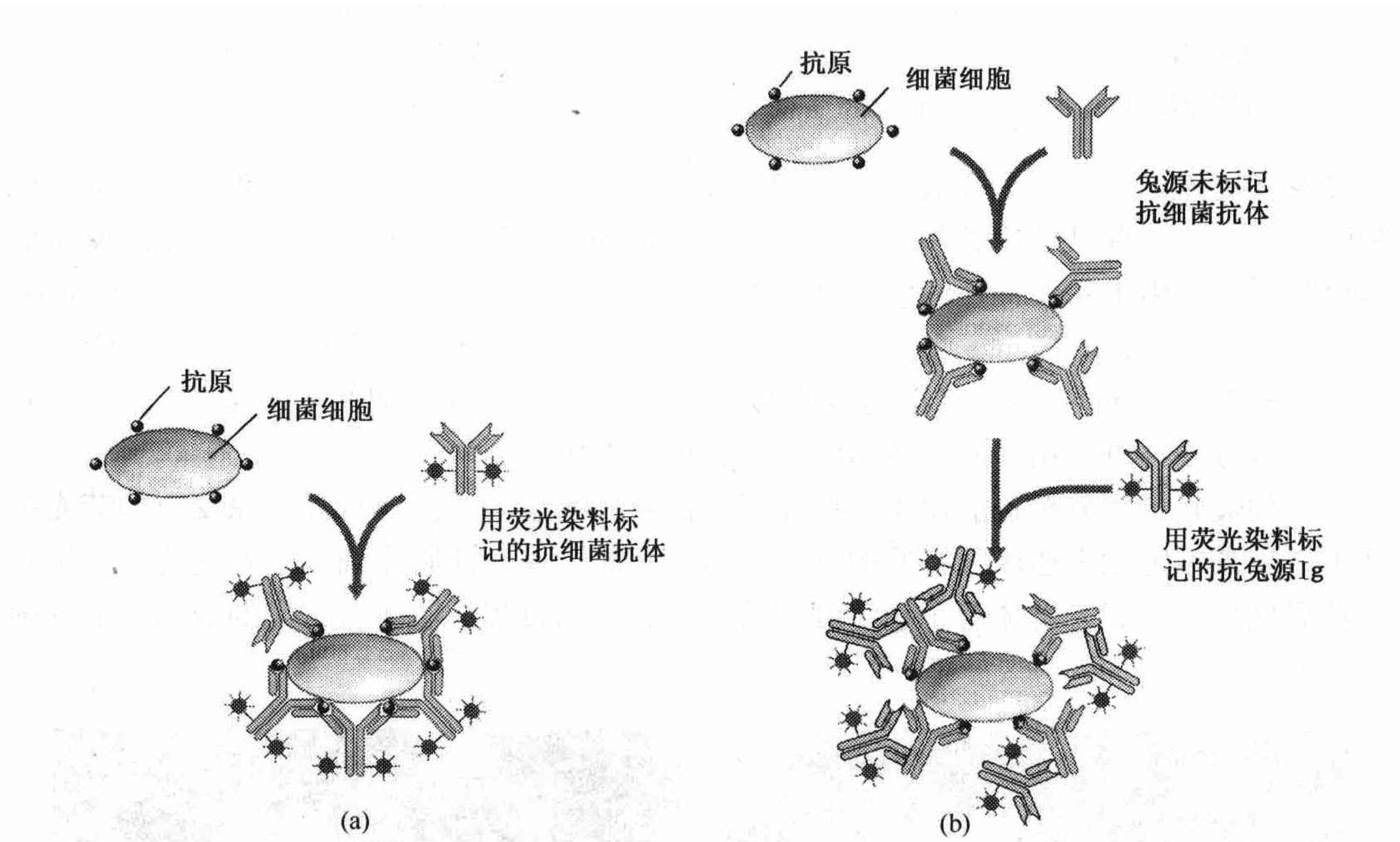


图 24.18　用于检测微生物表面抗原的荧光抗体方法。（a）直接染色法。（b）间接染色法。

临床应用

在典型的荧光抗体应用试验中，将一个带有疑似病原菌的病例与特异荧光抗体反应之后，用荧光显微镜进行观察。如果这种病原菌含有能与该抗体反应的表面抗原，那么细胞就会发出荧光（图 24.19）。

荧光抗体也可以直接用于感染的宿主组织，在分离可疑病原体之前就可以诊断出来。例如，在诊断军团杆菌病时（见 28.7 节），活组织解剖的肺部组织用抗侵肺军团菌（*Legionella pneumophila*）细胞壁抗原的荧光抗体处理，肺部组织被染上荧光即可得到阳性诊断（图 24.19a）。同样地，抗炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）细胞荚膜的

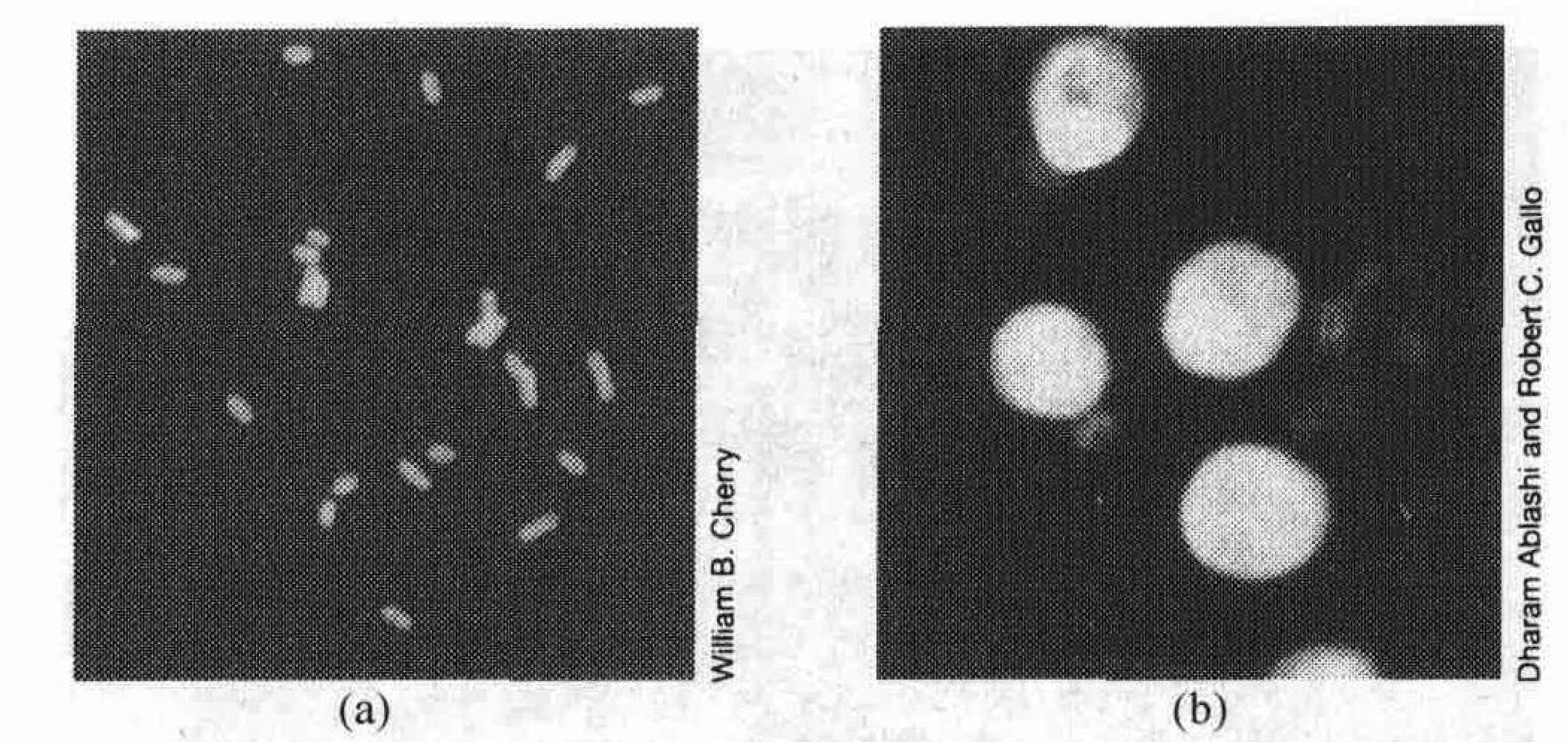


图 24.19 荧光抗体在临床微生物学上应用的例子。(a) 经免疫荧光染色的侵肺军团菌，该菌能引起军团杆菌病。样本来自于活组织解剖的肺部组织。单个菌体 2～5μm 长。(b) 用免疫荧光法检测病毒感染的细胞。人类 B 淋巴细胞病毒 (human B lymphotrophic virus，HBLV) 感染的脾细胞，用含有来自淋巴组织增生性障碍的患者的 HBLV 抗体的免疫血清培养，之后，细胞再用异硫基氰酸荧光素结合的抗人类 IgG 抗体处理。HBLV 感染的细胞呈亮黄色荧光。背景处的细胞没有与患者的血清进行反应。单个细胞直径约为 10μm。

直接荧光抗体，可以用于炭疽病的显微诊断（图 24.14）。这个方法也同样可以用来检测引起百日咳的百日咳博德特氏菌（*Bordetella pertussis*）（见 26.4 节）。直接荧光抗体检测还可以用于病毒感染的检测（图 24.19b）。常见的呼吸病原体流感病毒 A 和 B、副流感病毒（parainfluenza）、呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus）（RSV），以及腺病毒（adenovirus）可以通过直接荧光抗体的方法从病例的呼吸道中进行检测。荧光抗体方法还可以用来检测在组织或器官培养中生长的病毒（见 24.12 节）。

多种荧光抗体分析也能用于一些非感染性疾病的诊断。只与特异抗原反应的荧光抗体可以用来鉴定能表达该种抗原的细胞类型。例如，在恶性肿瘤细胞上发现的直接抗肿瘤特异性抗原的荧光抗体对于恶性细胞的鉴别和发病过程的监测有很大的应用价值（图 24.20）。

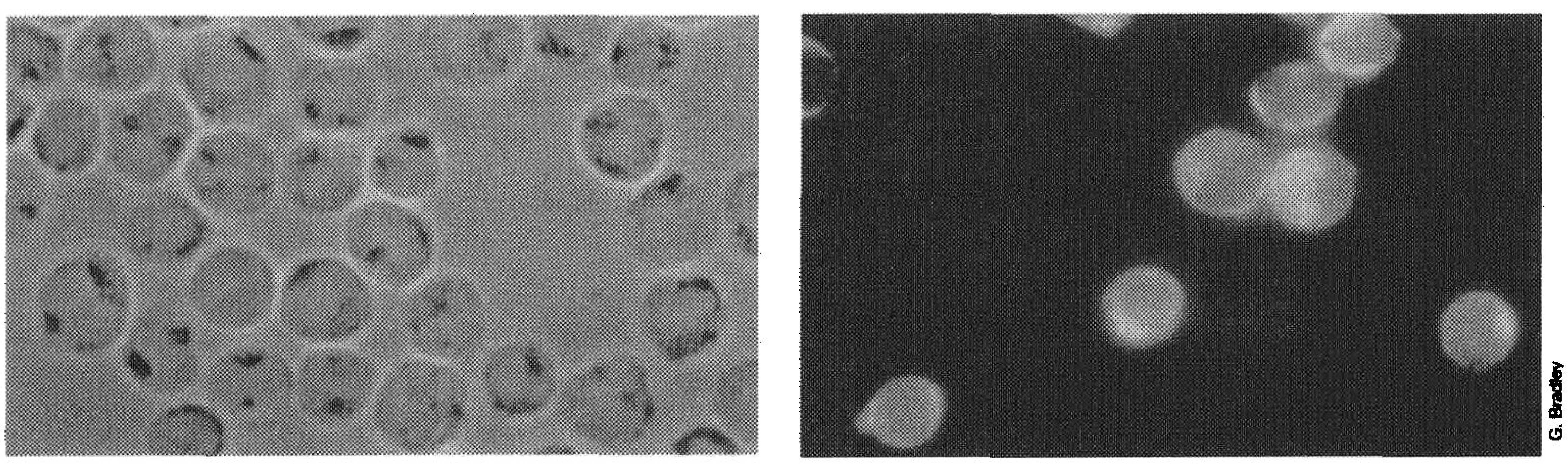


图 24.20 荧光抗体在非感染性疾病诊断中的应用。(a) 人类白血病细胞，其中一些对抗癌症药物敏感，而另外一些不敏感，照片中无法区分。(b) 当 (a) 中的细胞用荧光单抗处理后，只有药物抗性细胞的表面蛋白质被特异的结合，而药物敏感细胞不结合，而不发荧光。单个细胞直径为 10～12μm。

荧光抗体也可以用来分离细胞混合物为相对较纯的细胞群，或者可以用来确定复杂

混合物，如血液中特定细胞类型的数目。抗 T 淋巴细胞表面抗原 CD4 和 CD8 的荧光标记单克隆抗体（见 22.6 节），通常是用来鉴定及计数血液白细胞群中此类细胞的数目（图 24.21）。例如，获得性免疫缺陷综合征（AIDS）的确定就包括 CD4 细胞数量的减少。另外，在 AIDS 的发病过程中，CD4 T 细胞数量发生变化，并且可以此来诊断该疾病。这样，通过确定 CD4 的数目，临床医生可以检测出与正常细胞相比，CD4 细胞的减少量，然后再通过接下来的分析，就可以跟踪疾病的过程了（见 26.14 节）。

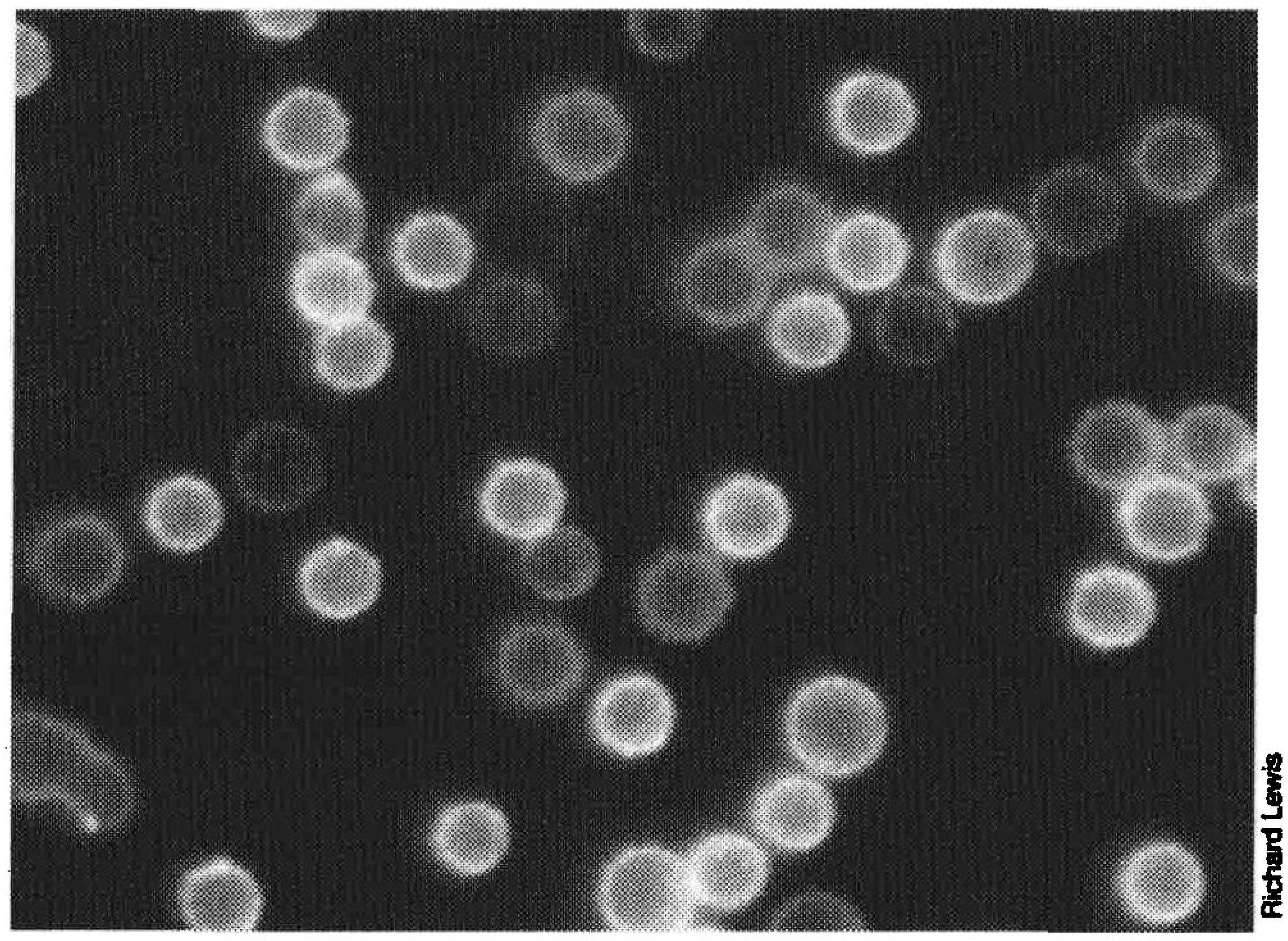


图 24.21 用特异表面标记的荧光标记单克隆抗体染色的 T 淋巴细胞。黄绿色细胞是 T_C（CD8）细胞；橙红色细胞为 T_H（CD4）细胞。不同颜色的细胞可以通过流式细胞仪进行分类并收集。单个细胞直径约 10.12μm。

荧光抗体标记细胞能够通过一种装置来观察、计数及分离，这种装置被称为荧光血细胞计数器（fluorescence cytometer），就是通常提到的流式细胞仪（fluorescenceactivate cell sorter，FACS）。FACS 利用激光束激发结合于细胞的荧光抗体，使标记细胞带上电荷，然后用一个电场作用于细胞混合物，荧光和非荧光细胞偏转向电场的不同的两极，每种细胞群被计数并被收集到一个试管中。使用多个抗体，每种抗体使用不同的荧光染料，这样就可以同时检测多个细胞标记。图 24.22 中显示了鉴定正常人和 AIDS 患者的 T 细胞 CD3 和 CD4 表面抗原的典型应用。

FACS 分析在研究应用中也很有价值。例如，免疫学家们通常利用 FACS 方法来分离复杂的免疫细胞混合物，之后他们就可以研究其中高丰度的细胞类群的特性。

在适当的条件下，利用荧光抗体会得到关于临床条件的快速、高特异性的信息。但是，荧光抗体技术也存在它们的“陷阱”，非特异性染色就是其中之一，这是由于各种细菌种间的表面抗原可能会产生交叉反应（cross-react），而其中的一些就可能会是正常菌群的成员。这在肠道细菌中是一个重要的问题，肠道细菌的脂多糖抗原（见 4.9 节）与许多种的很相似，因而造成了与多种荧光探针的结合。因此临床微生物学家使用非特异性血清作为对照，以确认其他免疫或微生物检测中的所有的正免疫荧光。

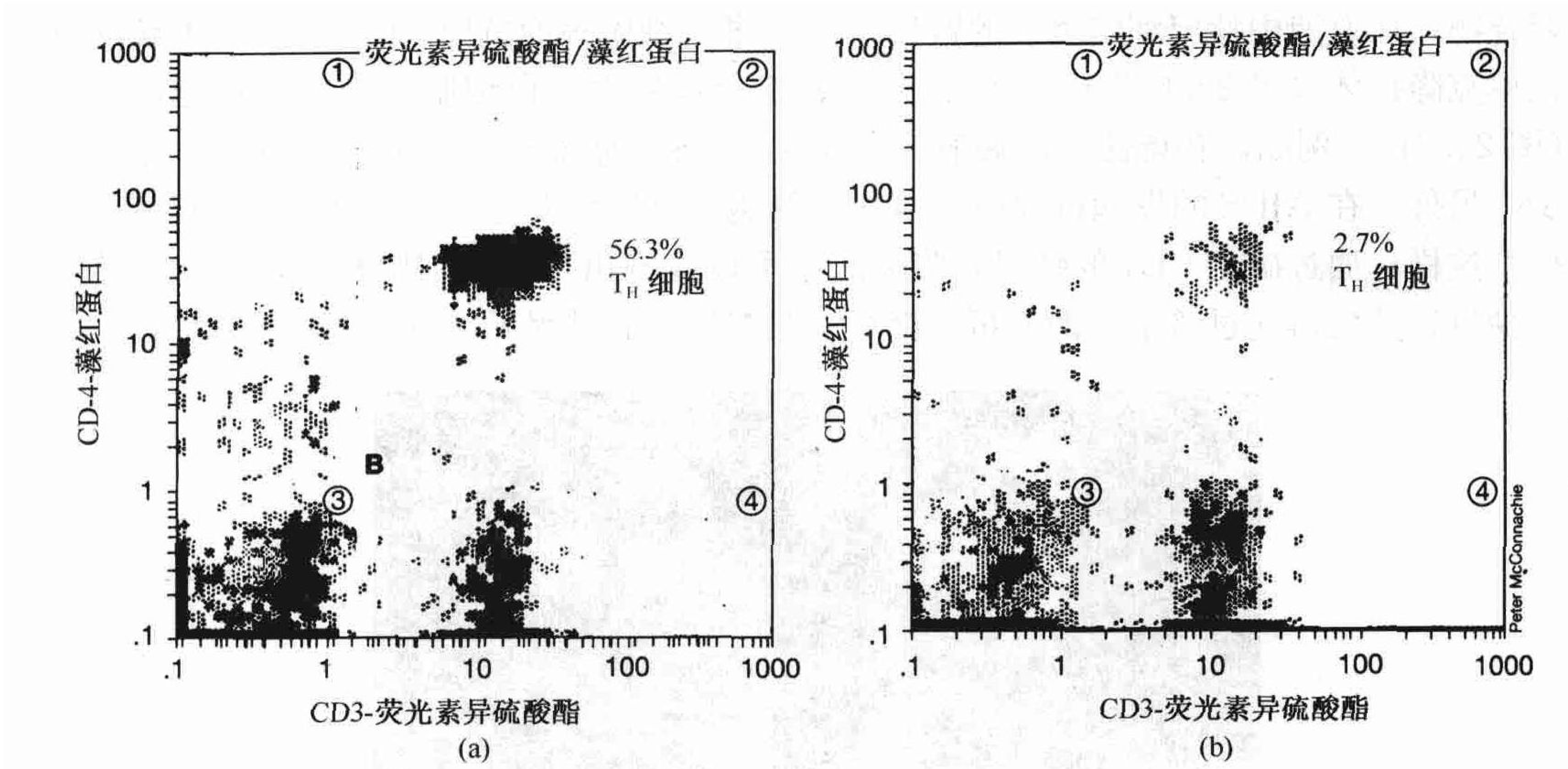


图 24.22 CD3 和 CD4 细胞计数。样品是从正常（a）及从获得性免疫缺陷综合征（AIDS）患者（b）身上获得的，使用流式细胞仪（FACS）计数。每个点代表一个单独的细胞。外围血细胞同时用结合藻红蛋白的 CD4 单克隆抗体和结合异硫基氰酸荧光素（FITC）的 CD3 单克隆抗体标记。CD3 存在于所有的 T 细胞上。CD4 只存在于 T-helper（T_H）细胞上。信号区 3 显示的是未用抗体染色的细胞。信号区 1 显示的是仅用抗 CD4 染色的细胞。信号区 4 显示的是仅用抗 CD3 染色的细胞。信号区 2 显示是用抗 CD3 和抗 CD4 同时染色的细胞。（a）正常人的检测结果。在这个例子中，T 细胞中 56.3%为 T_H 细胞。这样，信号区 2 显示为高密度染色型。（b）AIDS 患者的检测结果。这个例子中，T 细胞中仅有 2.7%为 T_H 细胞。这是由信号区 2 中很浅的染色状态表明的。

概念检查

荧光抗体用于对组织样品和其他复杂环境中的病原体和其他抗原性底物的快速、准确检测。荧光抗体方法能够应用于对多种细胞类型的检测、计数，以及分类。

◆ 解释并比较直接和间接荧光抗体分析的原理、优点及缺点。

◆ 如何利用荧光抗体在混合物如血液中，鉴定特异的细胞？

24.10 酶联免疫吸附测定和放射免疫

免疫反应的灵敏度很高，能够检测低浓度的抗原-抗体复合物（见 24.5 节，表 24.8）。由于其具有较高的灵敏度，酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）和放射免疫实验（radioimmunoassay，RIA）成为两种被广泛应用的免疫技术。这两种方法分别使用放射性和酶来探测抗体分子。因为放射性及某种酶反应的产物可在极小数量上测出，将放射性物质或酶配基连接到抗体分子上，就可以减少测定抗原抗体反应所需样品的数量，提高灵敏度，在临床诊断上很有用处，而且也打开了发

展多种免疫测定方法的大门。

ELISA

将酶共价连接于抗体分子上创造了一种既有高度特异性，又有高度灵敏性的免疫分析工具。这项称为 ELISA 的技术将酶共价连接到抗体后，酶的催化性质及抗体的特异性均不会改变。典型的连接酶包括过氧化物酶、碱性磷酸酶及β-半乳糖苷酶。这些酶催化的反应产物均有颜色，而且可以在数量非常低的情况下被检测出来。

有两种基本的 ELISA 方法，一种检测抗原（直接 ELISA），另一种检测抗体（间接 ELISA）。检测血液或粪便中病毒粒子的抗原时，用直接 ELISA，其方法是将抗原夹在两层抗体之间（图 24.23），因此，这种方法有时也被称作“三明治 ELISA”。将待测样品加到微孔板的小孔中，微孔板预先覆盖待测抗原的特异性抗体。如果样品中存在抗原（病毒颗粒），就会被抗体上的抗原结合点所“捕捉”。将未结合的物质洗去，加入含有连接酶的第二抗体。第二种抗体对抗原也有特异性，所以它可以结合于任何暴露的决定簇上，用水洗每个孔，加入酶的底物测定每个微孔中的酶活力，颜色的深浅与样品中所含抗原的数量成比例（图 24.23）。

为了检测人类血清中的抗体，可以用间接 ELISA。间接 ELISA 广泛用于检测人类免疫缺陷病毒（HIV）抗体。我们将详细讨论这种检测方法，因为它所包含的原理适用于所有间接 ELISA（图 24.24）。

改良的快速 ELISA 方法是将试剂吸附到固定的玻璃片、硝酸纤维素膜、塑料膜或塑料片支持材料上。这些实验将在短时间内在支持的材料上出现颜色变化。这些快速的反应可以用于诊断传染性疾病，如 HIV-艾滋病（见 26.14 节）或“喉咙痛”（由酿脓链球菌引起的咽喉感染，见 26.2 节）。

除了疾病诊断，快速检测也应用于怀孕检测和毒品检测（图 24.25）。在这些检测中，试剂与体液一般是尿或血液，反应以后，冲洗支持物，再用第二种试剂结合，该试剂能够区分抗原（直接检测）和抗体（间接检测，如艾滋病）。当需要检测少量样品时，如采集的尿或血液的量很少，该检测具有特别重要的价值，而且不具备实验技能的人也可以操作该检测。检测可以立刻得到结果，避免了病情的延误及随时获得检测结果。然而，与那些更精确的检测相比，该检测的缺点是特异性不高。因此，这些即时检测通常需要标准的实验室检测来确认。

HIV-ELISA

引起 AIDS 病的人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）（见 26.14 节）是由包括血液在内的体液传染的。人们需要快速、有效、便宜的筛选工具来保证在输血或血制品的运送过程中没有 HIV 污染。用 ELISA 来检测血液是否有 HIV 污染已成为常规筛选。

HIV-ELISA 检测是一种间接 ELISA，目的是要检测血浆中的 HIV 抗体。初次感染 HIV，会导致多种抗体产生，特别是那些带外膜的 HIV。可用 HIV-ELISA 来检测这些抗体的存在（图 24.24）。

要进行 HIV-ELISA 检测，微孔板首先用含破碎的 HIV 粒子的制备物覆盖，大约

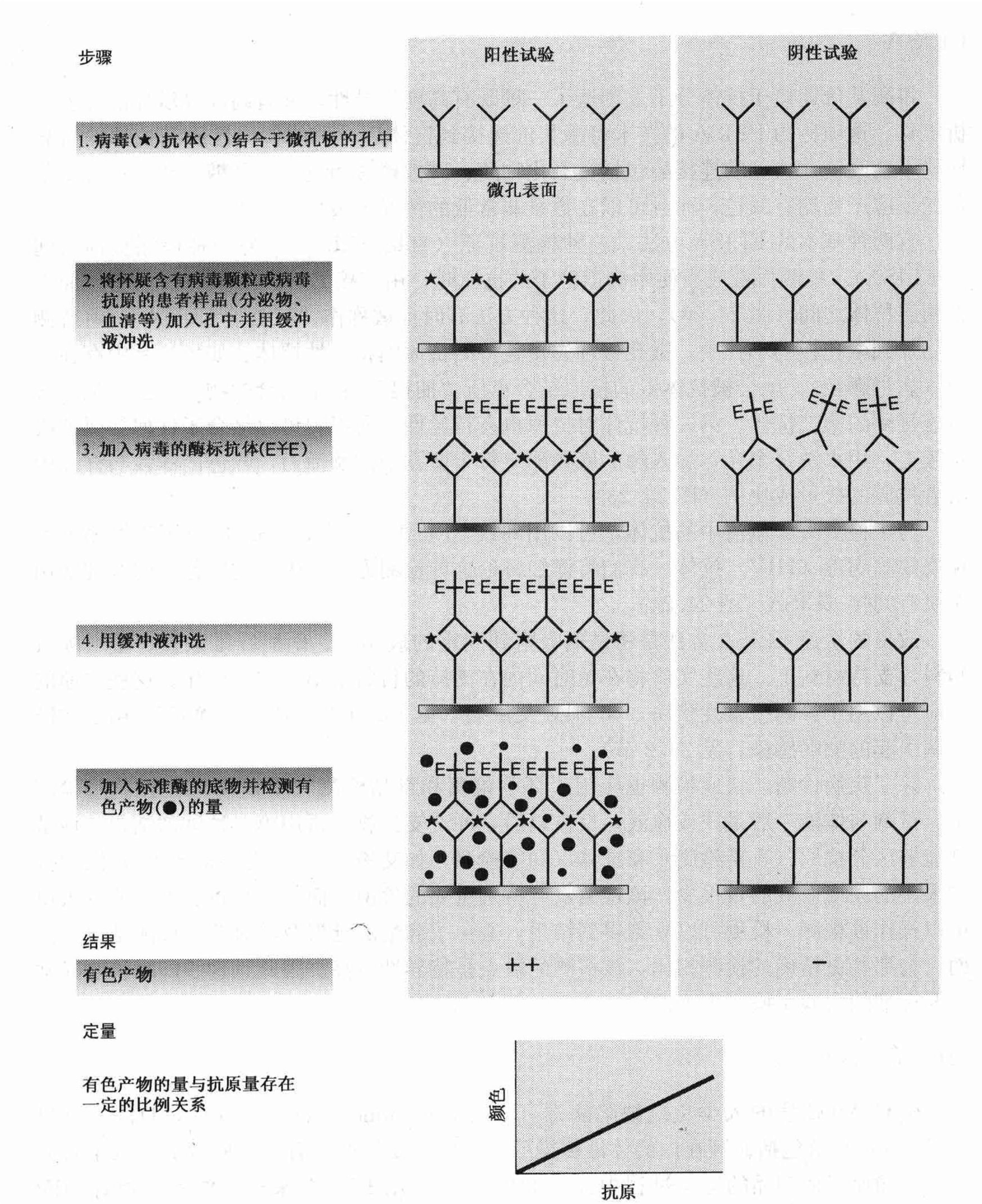


图 24.23 直接 ELISA 法试验。 直接 ELISA 法试验可以检测血液、尿和其他体液中的病原体的抗原决定簇或抗原性代谢物。

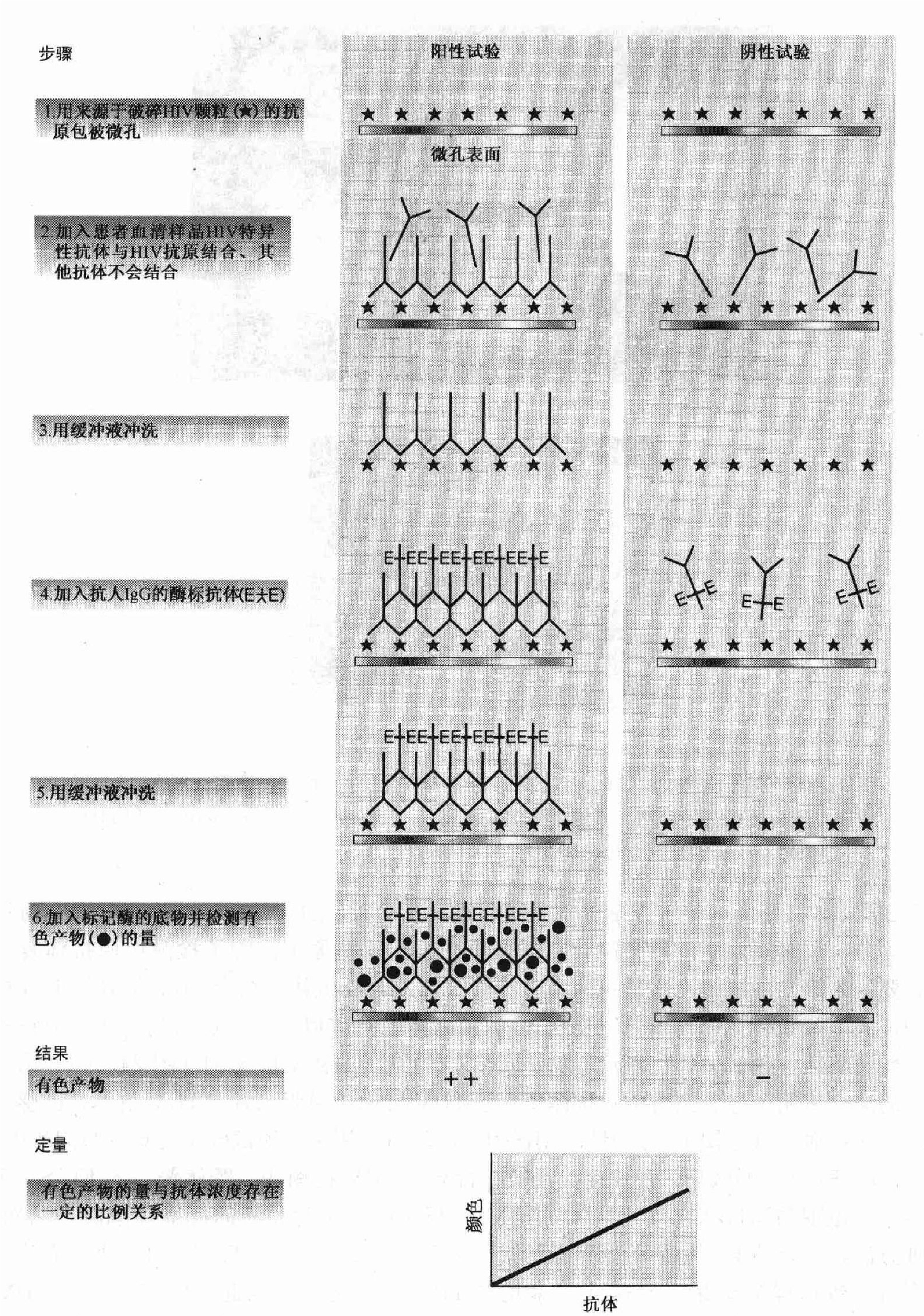
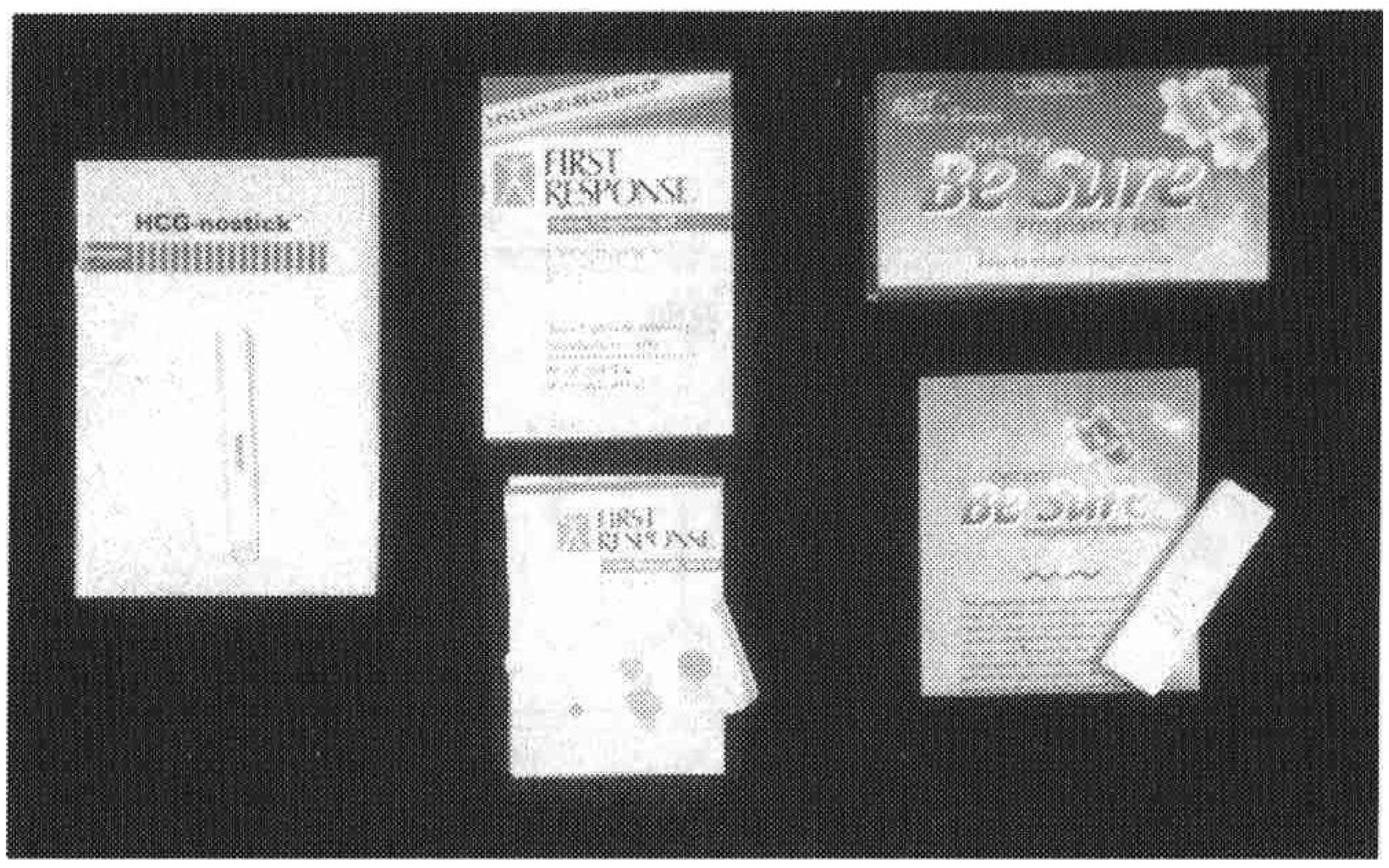
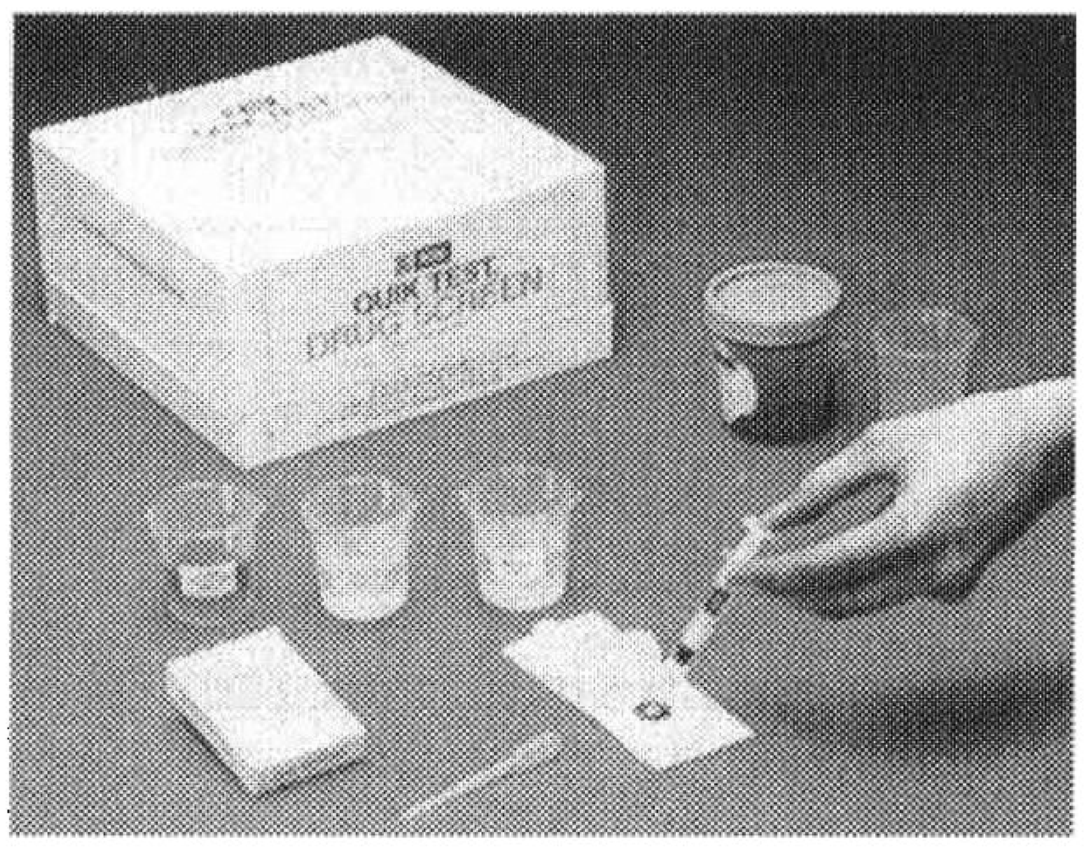


图 24.24　间接 ELISA 试验。间接 ELISA 法试验可以检测引起 AIDS 的 HIU。



John M. Martinko

(a)



Keystone Diagnostics, Inc.

(b)

图 24.25 快速 ELISA 检测试剂盒。早孕检测试剂盒（a）和药物检测试剂盒（b）已经在临床检测中获得应用。其他用于咽炎链球菌（*Streptococcus anginosus*）和 HIV-AIDS 等感染疾病的试剂盒也已经应用。

每孔 200ng，经短时间培养以确保抗原结合在微孔表面，加入稀释后的血清样品，将混合物培养一段时间，使 HIV 特异性抗体连接于 HIV 抗原上。为了检测抗原抗体复合物，要加入第二种抗体，这是一种有连接酶的抗人 IgG 抗体。结合 HIV 特异性 IgG 抗体的抗人 IgG 抗体此时与 HIV 抗原结合。加入第二抗体以后，再加入酶底物，分析酶的活性。酶活性测试中颜色深浅与抗人 IgG 抗体结合的数量成比例（图 24.24）。第二抗体的结合表明了患者血清中的抗体识别了 HIV 抗原，说明患者有 HIV 抗体，已感染 HIV。对照血清（已知 HIV 阴性）用任何样品均可，用来检测试验中背景的吸附程度。

HIV-ELISA 测试是一种快速、灵敏、特异的 HIV 检测法。既然普通的 ELISA 可以适合人范围的筛选及自动化测试，HIV-ELISA 就可作为血液的标准筛选法。然而，这种方法在一定情况下也会给出错误结果。例如，测试偶尔会出现假阳性，因为有许多因素可导致这样的结果，而这些因素均与 HIV 感染无关。因此，所有的阳性 HIV-ELISA 均必须用另外独立的测试来验证，通常用蛋白质印迹（免疫印迹）试验（见 24.11 节）。HIV-ELISA 阳性和随后的 HIV 蛋白质印迹阳性时才能认为有 HIV 感染。

HIV-ELISA 测试的缺点是可能得到假阴性结果。免疫系统需要一段时间来产生抗体（见 24.5 节），在 HIV 感染中，潜伏期是 6 周到 1 年。因此，刚刚感染 HIV 的患

者，可能检测时还没能产生可检测的抗体量。另外，HIV-ELISA 假阴性结果是因为免疫系统完全被破坏了，这由 AIDS 的晚期可见到，如果体内不存在任何免疫细胞，就不能产生抗体，ELISA 测试也就无能为力了。然而，在疾病的这一阶段，临床诊断是可能的，ELISA 只能作为一种确认手段了。

临床其他重要的 ELISA 试验

除了检测 HIV 的 ELISA 试验外，已经发展了数百种临床有用的 ELISA，其中有些是测定抗原的直接 ELISA，测定细菌毒素，如霍乱毒素、肠道病菌大肠杆菌毒素和金黄色葡萄球菌内毒素的直接 ELISA 试验已经确立。目前测定的病毒的直接 ELISA 技术，包括轮状病毒（rotavirus）、肝炎病毒、风疹病毒（rubella virus）、布尼病毒（bunyavirus）、麻疹病毒（measles virus）、腮腺炎病毒（mumps virus）及副流感病毒，都已确立。

测定各种临床重要细菌抗体的间接 ELISA 技术也已建立起来，尽管我们无意列出全部目录，但测定血清中抗细菌抗体的 ELISA，已确立的至少包括如下病原菌沙门氏菌属（肠胃疾病）、耶尔森氏菌属（*Yersinia*）（鼠疫）、布鲁氏菌属（波浪热）、各种立克次氏体（落基山斑疹热、斑疹伤寒、Q 热）；霍乱弧菌（霍乱）、结核分枝杆菌（结核）、麻风分枝杆菌（麻风）、侵肺军团菌（军团病菌）、布氏疏螺旋体（Lyme 病）、苍白密螺旋体（梅毒）。另外，还有测定抗假丝酵母属（*Candida*）和各种寄生虫抗体的 ELISA，包括引起阿米巴病、锥虫病、血吸虫病、弓浆虫病和疟疾等。

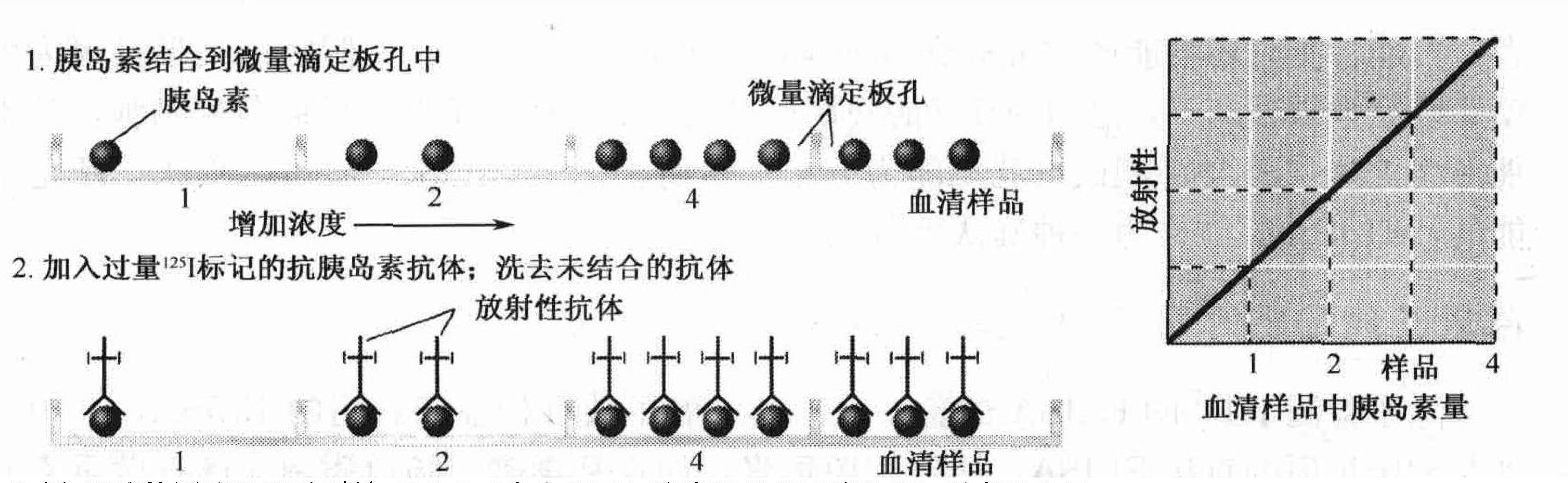
快速、低廉、无放射性污染及使用寿命长使 ELISA 实验受到众多测试人员的格外关注；而其高度的灵敏性已经使其成为重要的免疫诊断工具。

放射免疫实验

放射免疫实验（radioimmunoassay，RIA）是应用放射性物质代替 ELISA 中的酶作为抗体的偶联物。同位素碘 125 是最常用的测定系统，因为抗原和抗体能够被碘化。RIA 在临床上常被用来检测血清中的稀有蛋白质，如人生长素、胰高血糖素、抗利尿激素、睾丸素和胰岛素等人体内含量极少的蛋白质（图 24.26）。有时也用于违禁药物检测。

绝大多数情况下，都用直接 RIA 法。直接实验分为两步：首先，将具有放射性的抗原特异性抗体加到含有已知浓度的纯抗原系列微孔中（如荷尔蒙），放射性标记的抗原预先结合在孔中，然后测定每一标准孔的放射活性，制作一条抗原浓度的标准曲线；第二步，将患者抗原样品结合到另一孔中，与第一步相同，加入放射性抗体. 并测定放射活性。然后用患者样品结合的放射活性的数量与标准孔比较。从标准曲线中可推算出患者血清中的抗原浓度（图 24.26）。

RIA 不仅与 ELISA 有相同的的灵敏度范围（表 24.8），而且也能快速得出结果，但是，测定放射活性必须使用专门设备，且很昂贵；另外，RIA 会产生不可忽视的放射性污染，而且，所用放射性同位素其放射性衰减时间（半衰期）也限制了实验系统的使用寿命。因此，只有当 ELISA 不能满足测定的精确度和灵敏度时，才用 RIA 来检测。例如，测定血清蛋白水平（如上所述），RIA 比 ELISA 更常用，因为有些成分会



3. 用γ射线检测器检测放射性，孔1、2、4中含有已知浓度的抗原（胰岛素）用来建立标准曲线，最后的孔中测得的放射性数值与标准曲线相比就可以得到血清中胰岛素的含量

图 24.26　放射免疫实验（RIA）。 应用 RIA 来测定人血清中胰岛素的水平，下面是标准曲线的制作和血清样品中的胰岛素浓度的测定。

抑制 ELISA 中酶与底物的反应。也就是说，对某些应用来说，每个实验系统都有其明显的优点。

概念检查

ELISA 和 RIA 方法是迄今为止最灵敏的测试技术。二者都含有一个偶联的测定系统，酶或放射性分子被连接到抗体或抗原上，以提高抗原抗体反应的灵敏度，在检测抗体或抗原方面具有广泛的应用。ELISA 和 RIA 都用于临床和科学研究，在很多应用中都设计一些检测抗原或抗体的试验。

◆ 为什么 ELISA 和 RIA 技术比经典的免疫学实验，如沉淀反应和凝聚反应更灵敏？

◆ 比较 ELISA 和 RIA 各自的使用范围、优点和缺点。

24.11　免疫斑点试验

抗体也可用于免疫印迹（immunoblot），以确定某种与特异性病原体有关的特异性蛋白质，甚至在复杂的混合物如细胞裂解液或血液中。免疫斑点应用到已讨论过的三种技术：①聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质；②将蛋白质从凝胶转移到硝酸纤维膜上；③用特异性抗体鉴定蛋白质。蛋白质斑点和随后用特异性抗体对蛋白质的鉴定被称为“Western”印迹（Western blot）技术，以和 DNA 的“Southern”印迹（Southern blot）技术相区别（见 7.7 节）。

免疫斑点的第一步，蛋白质混合物在聚丙烯酰胺凝胶中电泳。蛋白质分离呈现数条带，每一条带代表一种特定分子的蛋白质（图 24.27）。然后通过电泳转移过程将这些蛋白质转移到硝酸纤维膜上，这个过程迫使蛋白质从胶上出来进到膜上。这时，将抗患者蛋白质抗体或抗蛋白质上某一基团的抗体加到硝酸纤维斑点上，经短时孵育，使抗体与斑点充分结合。再加入结合有抗原-抗体复合物的放射性标记物。常用的放射性标记物是放射性^{125}I 碘化的葡萄球菌 A 蛋白。A 蛋白与抗原-抗体复合物有很强的亲和力，

与它们结合得很牢固。一旦放射性标记被结合，将硝酸纤维膜暴露在 X 射线下即可测得斑点的位置；^{125}I 放射的 γ 射线只在膜的某一区域暴露。那么，这个区域就是放射性抗体与抗原-抗体复合物结合的部位（图 24.27）。

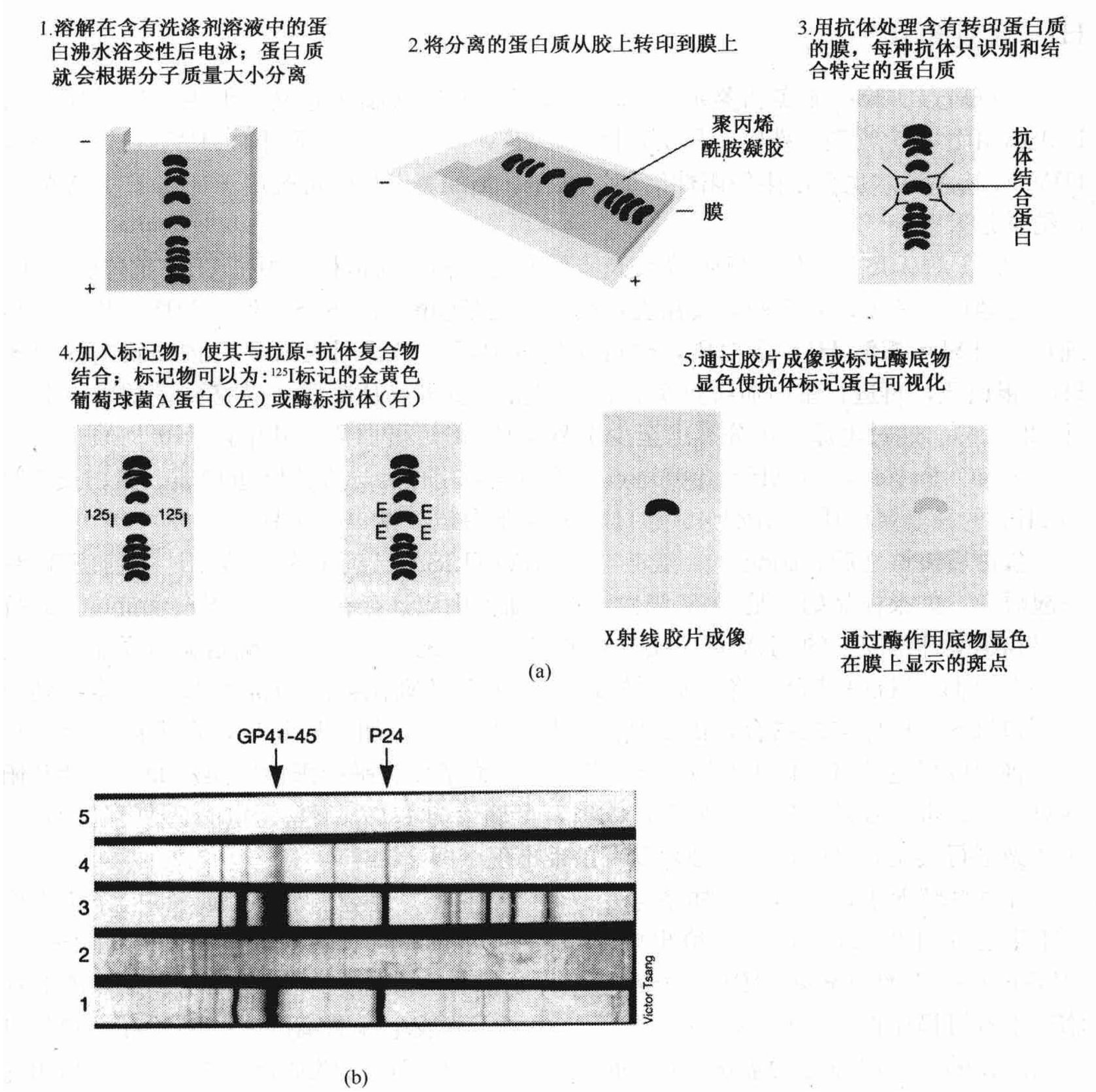


图 24.27　Western 印迹（免疫印迹）和它在人类免疫缺陷病毒（HIV）感染诊断中的应用。(a) 免疫斑点实验方案。(b) 发展了 HIV 免疫斑点实验。蛋白 P24 和外壳蛋白 GP41-45 是 HIV 的诊断（特异性）蛋白质。第 1 列，阳性对照血清（来自 AIDS 患者）；第 2 列，阴性对照血清（来自健康志愿者）；第 3 列，强阳性患者样品；第 4 列，弱阳性患者样品；第 5 列，空白实验，以检查背景结合情况。

在许多临床应用中，常用酶联免疫吸附测定（ELISA）测定抗原-抗体复合物。其方法是用特异性抗体处理斑点蛋白质，洗涤，然后再用二抗结合，且要与酶共价连接。因此，当检测酶时，起初的抗原-抗体复合物也就成为肉眼可见的了，膜上酶标记的二抗结合到与抗原反应的抗体的位点，酶反应的产物有颜色。通过比较硝酸纤维膜上色带

与对照样品色带的位置，就可以确定所检测的病原体蛋白质。

免疫斑点实验既可用来检测抗原（直接证明病原体的存在），也可用来检测抗体（间接证明病原体的存在）。

HIV 免疫斑点

免疫斑点实验在证实和鉴定 AIDS 的起因方面很有临床意义。但由于这种实验与 ELISA 相比更为繁琐、费时、昂贵，因此，HIV-ELISA 被广泛用于 HIV 筛选。然而，HIV-ELISA 偶尔也会产生假阳性结果，这样，免疫斑点实验常被用于证实 E1ISA 的阳性结果是否正确。

和 HIV-ELISA 一样，HIV 免疫斑点实验也可检测血清样品中抗 HIV 抗体的存在。为更好地进行免疫斑点实验，要用去污剂十二烷基磺酸钠（SDS）处理 HIV，以进一步纯化。用 SDS 溶解 HIV 蛋白质，也可使病毒灭活。然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨 HIV 蛋白质，再进行蛋白质斑点实验，再将蛋白质斑点从凝胶上转移到硝酸纤维膜上（图 24.26）。通过电泳，可分辨出至少 7 种主要 HIV 蛋白质，其中两种蛋白质分别定为 P24 和 GP41-45，在 AIDS 免疫斑点实验中常被用作特异性诊断蛋白质。蛋白质 P24 为 HIV 的核心蛋白质，GP41-45 为 HIV 外壳蛋白质（见 16.15 节）。

蛋白质斑点之后，硝酸纤维膜要与经 HIV-ELISA 已确定为 HIV 阳性的血清样品一起孵育。如果样品确实是 HIV 阳性，那么血清中应该存在抗 HIV 蛋白质抗体。此抗体将和硝酸纤维膜上的 HIV 蛋白质分离带相结合（图 24.27）。为确定血清样品中的抗体是否与 HIV 抗原结合，将一鉴别抗体即连接有过氧化物酶的抗人 IgG-抗体加到膜上。如果鉴别抗体与之结合，由于其连接酶的作用，当加入底物后，在抗体结合位点上，将形成褐色条带。以 HIV-ELISA 阳性患者血清作为平行阳性对照。如果患者和阳性对照的条带位置是一致的，那么，此患者可确诊为 HIV 阳性。同时还要用阴性对照血清做平行实验，且阴性对照必须没有条带出现（图 24.27）。

在某些情况下，虽然一个样品与另一个样品的 HIV 免疫斑点实验得到的条带强度是不定的（图 24.27b），但它给出的结果是肯定的，也就是说，这种实验对于确定 HIV-ELISA 阳性和排除 HIV-ELISA 假阳性是很有价值的。为使 HIV 免疫斑点实验在临床中有可操作性，含有灭活 HIV 抗原（预先用凝胶电泳分离的）的硝酸纤维膜是可以商品化的。用这种已电泳分离的抗原纸条与患者及阳性对照血清直接孵育，然后用鉴定抗体处理。

免疫斑点技术常用于对 Lyme 病抗体的特异性筛选实验（表 24.5）。但是由于其价格昂贵、技术要求高、低敏感性（但是高特异性）和时间拖延等问题，对于一般的筛选用途，免疫斑点实验并不能替代快速、廉价的 ELISA 方法。

概念检查

免疫斑点实验可以用来检测特异抗原的抗体，也可用来检测抗原本身。抗原经电泳，转移（杂交）到膜上，再与抗体作用；通过酶标或放射性标记的二抗使上述免疫复合物成为肉眼可见的。免疫斑点实验是非常敏感可靠的，但其操作复杂费时。

◆ 免疫斑点实验与 ELISA 和 RIA 等免疫实验相比有何优点？
◆ 为什么免疫斑点实验不能用于常规的 HIV 检测？

Ⅲ 分子和可视诊断方法

目前，用于检测病原体的非常灵敏的分子和电子显微镜方法已经应用。这些方法不依赖于病原体的分离、生长或其免疫应答。由于病原体有时很难在培养基上培养和鉴定，基于分子生物学和物理学的非生长依赖性检测方法已经得到广泛应用。

24.12 核酸诊断方法

分子检测方法广泛地应用在诊断生物学中，这些方法是用基因型的特征而不是表型特征来鉴定特异性病原体。成功运用基因或基于 DNA 的诊断方法必须遵循以下原则：①可以很容易地从被感染的组织中分离出核酸；②核酸可以很容易地可视化和检测；③特定病原体的核酸序列必须是唯一的，可以通过核酸分析准确鉴定病原体；④核酸序列可以扩增到分析所需的浓度。

诊断中的核酸探针

核酸杂交（nucleic acid hybridization）是临床微生物学家最有潜力的分析工具之一。用 DNA 杂交检测有无特异性微生物的相关特异性 DNA 序列，而不用检测整个微生物或其代谢产物。欲通过 DNA 分析鉴定微生物的话，必须具备适合这种微生物的 DNA 探针，这种核酸探针（nucleic acid probe）通常是微生物独特序列的单链 DNA。典型的探针的长度通常有数个 kb。如果临床标本中微生物的 DNA 序列与探针互补，那么两个序列可以杂交（这样可以得到此微生物的单链 DNA），形成双链 DNA 分子（图 24.28）。为检测杂交反应是否发生，探针需要用“报道分子”（reporter molecule）标记，如同位素、酶或荧光化合物等在杂交后可以被检测出的物质。根据所采用的标记物（同位素是最敏感的），每份 DNA 样品只要有 0.25μg 就能测出来。

核酸探针与临床免疫学实验相比具有许多优点，在高温、高 pH、有机溶剂和其他化学试剂条件下，核酸比蛋白质稳定得多。由于目的核酸和核酸探针的化学稳定性好，核酸探针技术可以用来检测已经死亡的微生物。此外，核酸探针比抗体特异性更强，甚至可以检测出只有一个碱基差别的 DNA 序列。

临床实验室中的探针

在绝大多数临床探针实验中，用强碱处理平皿菌落或感染组织，通常为 NaOH，使细胞溶解及 DNA 部分变性，形成单链分子（图 24.28）。然后将混合物黏附到滤纸上或留在溶液中，再加入标记探针，在适当温度下使其杂交，形成稳定的双螺旋。但目的 DNA 和探针 DNA 之间必须有相当的同源性才行（在特定的探针实验中，实际所使用的温度是由探针和目的 DNA 的核苷酸组成和长度决定的）。

然后洗去未杂交的探针 DNA，已杂交的 DNA 长度用连接到探针上的报道分子来

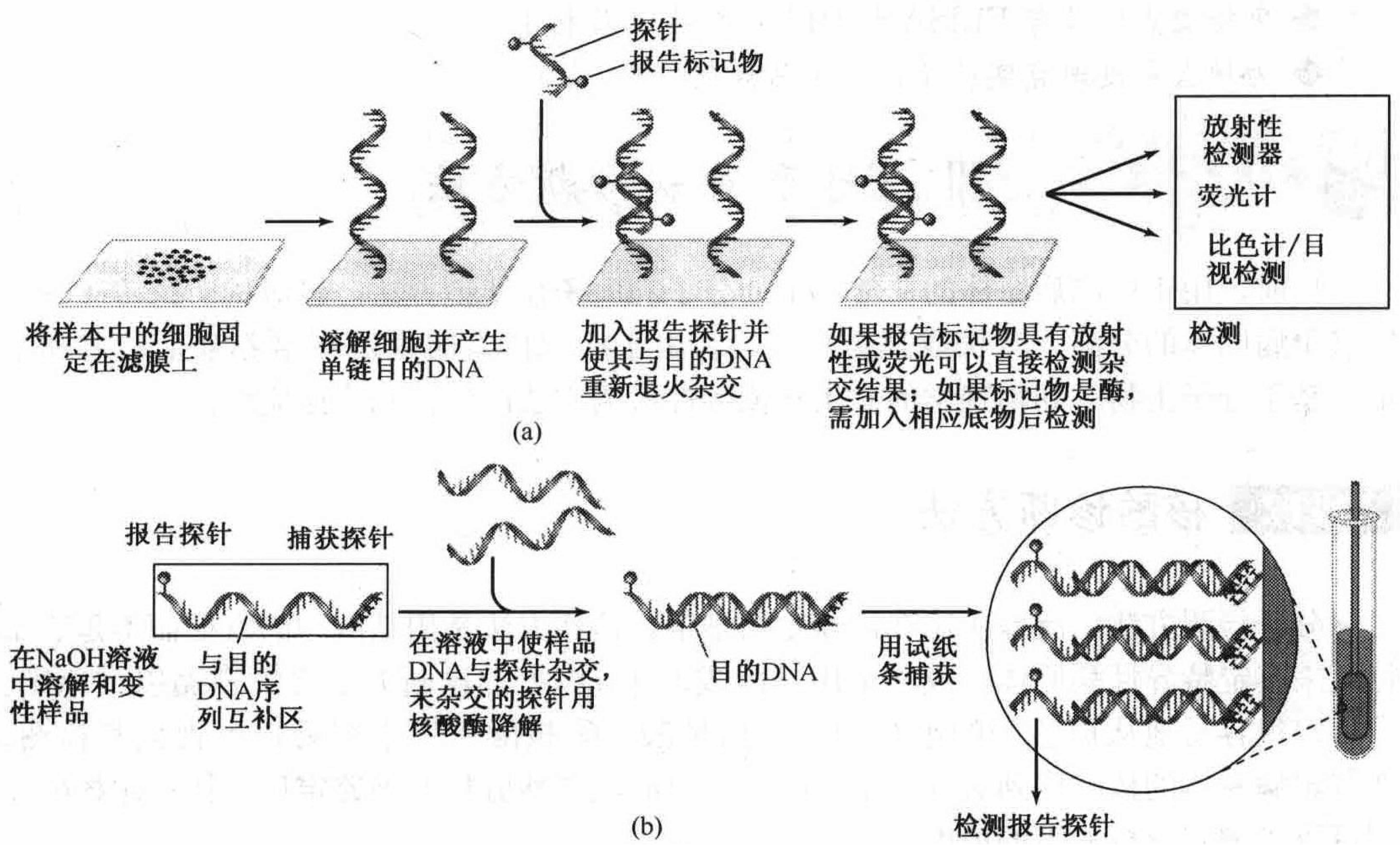


图 24.28 临床诊断中的核酸探针方法学。（a）膜过滤实验，检测系统（报告标记）可以是放射同位素、荧光染料或酶。（b）试纸条实验，在此实验中要用到两种探针，报告探针和捕获探针，捕获探针含有多聚 dA 尾巴，它可以和试纸条上的多聚 dT 杂交，组成寡核苷酸-目的序列-报告标记的复合物。杂交链的检测方法同（a）。

测量。根据探针的标记，测量可包括放射性、酶活性和荧光染料的测定。用于鉴定几种主要病原微生物的核酸探针已经商品化，同时在检测淋病奈瑟氏球菌和砂眼衣原体方面也被广泛应用（见 26.12 节和 26.13 节，表 24.9）。

不过，除了在临床应用外，探针在食品工业和食品添加剂中也被广泛应用。探针测试系统可以用于常规的食品检测，如对其中重要的病原体如沙门氏菌属和葡萄球菌属含量的检测。在食品探针实验中，通常要经过一个富集阶段，以使食品中为数不多的细菌繁殖到用探针可以检测的数量。为食品工业应用所设计的探针是用探针浸棒从溶液中去除已杂交的 DNA。这里要用两种探针，一个是报告探针，一个是捕获探针（图 24.28b）。报告探针或捕获探针与目的 DNA 杂交后将浸棒插入杂交溶液中，它含有与捕获探针互补的序列（通常为 poly dT 对探针上的捕获 poly dA），诱捕已杂交的 DNA，将其从溶液中取出并进行测定。

表 24.9 核酸探针和 PCR 法鉴定病原体

病原体	疾病
细菌	
弯曲杆菌属（*Campylobacter*）	食物感染
砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）	性病综合征、砂眼
肠球菌属（*Enterococcus*）	医院感染
大肠杆菌（*E. coli*）（肠道病原菌株）	胃肠疾病
流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）	传染性脑膜炎

续表

病原体	疾病
细菌	
侵肺军团菌（*Legionella pneumophila*）	肺炎
单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）	李斯特氏病
鸟分枝杆菌（*Mycobacterium avium*）	结核
结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）	结核
人型支原体（*Mycoplasma hominis*）	尿道感染、盆腔炎
肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*）	肺炎
淋病奈瑟氏球菌（*Nesseria gonorrhoeae*）	淋病
脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）	脑膜炎
发疹伤寒菌属（*Rickettisa*）	斑疹伤寒症、出血性发烧等
沙门氏菌属（*Salmonella*）	胃肠疾病
志贺氏菌属（*Shigella*）	胃肠疾病
金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）	化脓性感染（疖、疱、脓性皮肤感染）
酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）	猩红热、风湿热、脓毒性咽喉炎
肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）	肺炎
苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*）	梅毒
真菌	
皮炎芽酵母（*Blastomyces dermatitidis*）	芽生菌病、酵母病
假丝酵母属（*Candida*）	念珠菌病、鹅口疮
粗球孢子菌（*Coccidioides immitis*）	球孢苗病
荚膜组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*）	组织胞浆菌病
病毒	
巨细胞病毒（cytomegalovirus）	先天病毒感染
EB病毒（Epstein-Barr virus）	伯基特淋巴瘤、单核细胞增多症
肝炎病毒（hepatitis virus）A、B、C、D、E	肝炎
人疱疹病毒（herpes virus）（Ⅰ型和Ⅱ型）	唇疱疹，生殖道疱疹
人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）	获得性免疫缺陷综合征（AIDS）
人乳头状瘤病毒（human papilloma virus，HPV）	外阴疣；宫颈癌
流感病毒（influenza virus）	呼吸道疾病
多瘤病毒（polyoma virus）	神经疾病
轮状病毒（rotavirus）	胃肠病
原生动物	
多氏利什曼原虫（*Leishmania donovani*）	利什曼病
疟原虫属一个未知种 *Plasmodium* sp.	疟疾
肺囊虫（*Pneumocystis carinii*）	肺炎
阴道毛滴虫（*Trichomonas vaginalis*）	毛滴虫病
锥体虫属一未知种 *Trypanosoma* sp.	锥虫病

基于16S核糖体RNA（rRNA）序列的细菌分型取得了重大进展（见11.6节）使得构建种特异性甚至是菌株特异性的核酸探针成为可能。根据rRNA序列特异性进行分型的方法称为核糖体分型，当来自不同微生物的DNA被限制性内切核酸酶酶切时，rRNA基因就会显示出特有的DNA酶切图谱来表征不同的核糖体型（见7.7节）。经过酶切的DNA可以用琼脂糖凝胶进行分离，同时用一个标记的rRNA探针表征rRNA基因特有的酶切图谱（见11.11节和图11.23）。在同一个种内，尤其是同一个菌株内，

酶切图谱是高度保守的，是一种微生物的分子指纹图谱。由于所有的微生物都有核糖体RNA基因，核糖体分型广泛用于微生物的临床诊断和基因型研究。

核酸探针可以检测样品中低于1μg的核酸，相当于从10^6个细菌或10^8个病毒颗粒中抽提的DNA的量。尽管分子探针不如直接培养法（样品中1～10个细胞就能被检测出来）灵敏，但是探针检测法在很难培养或不能培养的微生物检测中是非常有用的。同时，应用其他DNA技术可以和培养法的灵敏度相似。

诊断学中的聚合酶链反应

非常短的序列特异性寡核苷酸（通常长度在15～24个核苷酸）可以作为聚合酶链反应（PCR）的引物从特定病原体中扩增DNA。PCR被广泛用于生物学研究，同时也是一种重要的临床诊断工具（见7.9节）。典型的PCR反应可以将目的DNA扩增10 000倍，这样就可以使从单个细菌中获得的一条DNA链可视化。例如，可以利用病原体特异性基因的序列特异性引物检测可疑感染组织来源的DNA，甚至是不可见和不可培养的病原体都可以被检测。这些方法在检测病毒或胞内感染时尤其重要，如果扩增到合适的基因片段（图24.29）就说明有相应的病原体存在。

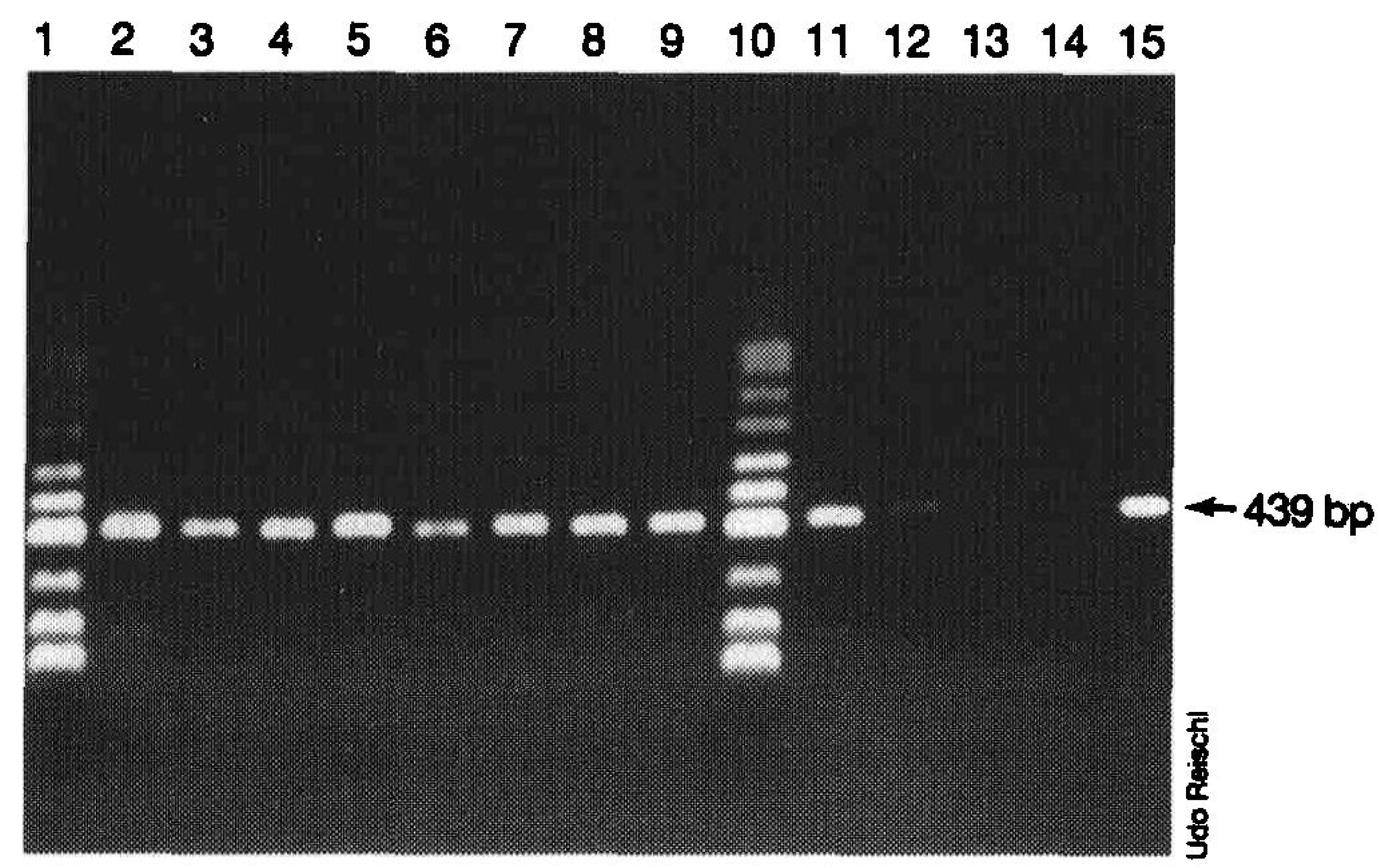


图24.29 患者痰样的PCR分析，以诊断结核分枝杆菌引起的结核。 用患者的痰样作为DNA的来源，用引物启动扩增，当用结核分枝杆菌纯培养作为DNA来源时，扩增产生一个439bp的产物（第15列）。2～9列及11、12列是从结核分枝杆菌阳性痰样中得来的。13、14列是从结核分枝杆菌阴性痰样中得来的。1、10列是分子质量标记物。PCR技术的描述见10.17节。

几种可以利用核酸杂交或PCR方法诊断的特殊微生物见表24.9。多种PCR被用于临床诊断实验室，最近，包括实时PCR（real-time PCR）在内的多种PCR检测技术被用于临床微生物诊断。实时PCR应用了荧光标记的引物，PCR仪配有精确的光学检测系统，可以根据标记引物检测每轮PCR获得产物量。扩增曲线可以反应标记引物的消耗量，同时反映产物的生成量。有PCR产物生成就说明目的微生物的存在。实时PCR可以实时显示PCR结果，避免了以后的DNA检测方法，如电泳检测法。

RT-PCR（反转录PCR）是另一种PCR技术，用于HIV-AIDS的扩增，将在26.14节进行讨论。这种方法用于从病原体特异性RNA样品中扩增cDNA，像反转录酶病毒，如HIV（见9.13节）。

概念检查

核酸杂交是一种非常有用的实验室微生物鉴定工具。为了设计探针，感兴趣微生物的特异性核酸序列必须是已知的。可能探针技术的最普遍的应用是在基因的 PCR 扩增技术上。目前，基于 DNA 的方法学广泛应用于临床、食品和研究实验室。

◆ 对微生物鉴定来说，核酸杂交法比标准培养法有什么优点？什么缺点？

◆ 举出一个只能用核酸杂交或 PCR 方法检测，而不能用标准培养技术进行鉴定的病原体例子。

24.13 诊断病毒学

由于病毒是专性胞内寄生，因此，对动物病毒病原体的鉴定和诊断方法与病原细菌有很大的区别（第 9 章）。病毒不能在细胞外复制，因此病毒不能在人工培养基上直接培养，只在哺乳动物细胞中培养。然而，病毒和它引起细胞病变的特征可以直接观察，目前已经有很多直接或间接的病毒型病原体的体外鉴定方法。

体外病毒培养

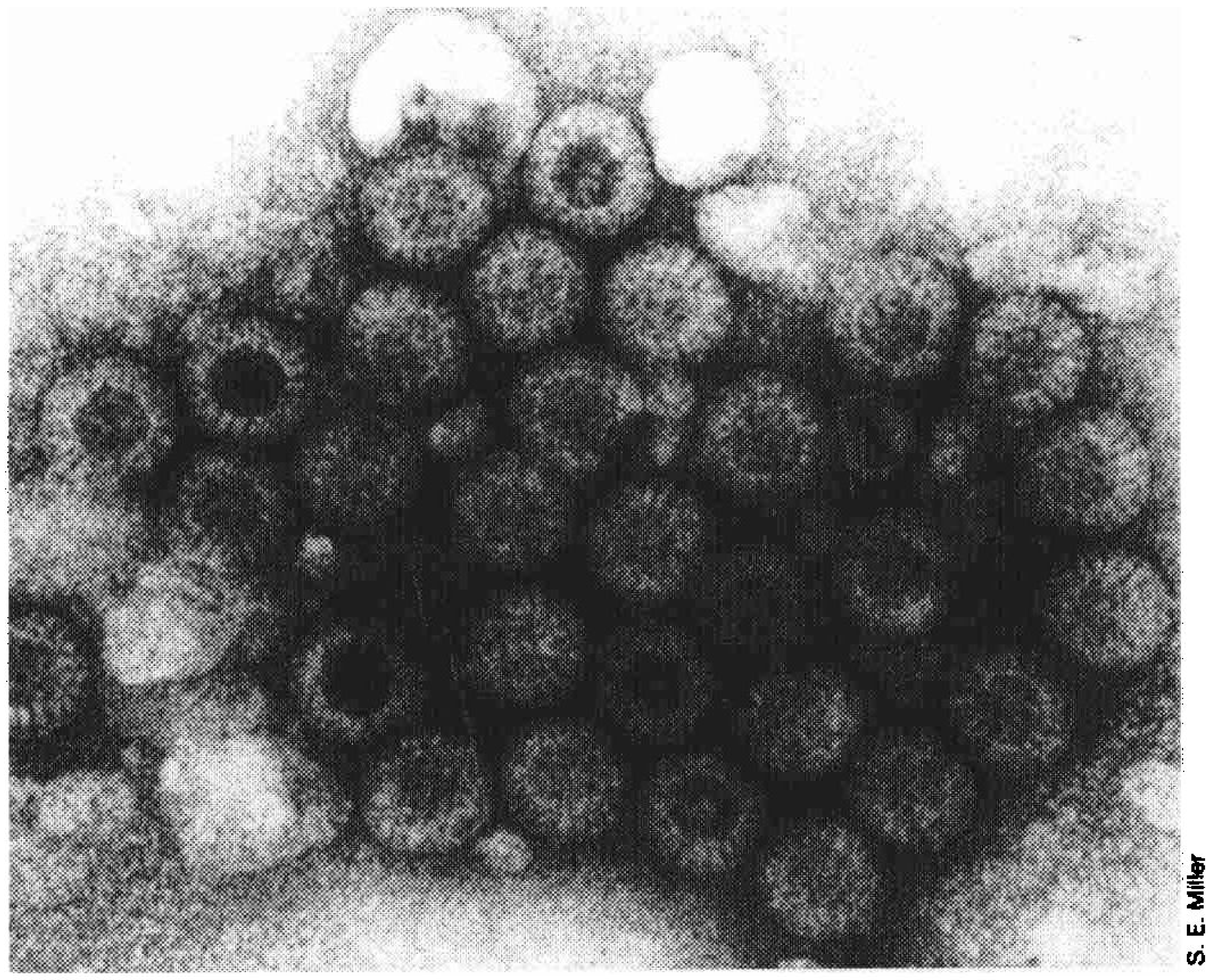
由于病毒只能在活细胞中生长，临床材料中的病毒比绝大多数细菌的实验室培养更困难、更费时，也更专业化。我们已经在 9.3 节中讨论了病毒生长的细菌培养，而且这种培育法在诊断病毒学中是通用的。几种生命周期比较长的人细胞系也可用来繁殖病毒，这些细胞系通常称作永生细胞系（immortal cell line），它们在细胞培养基上能迅速生长和再生，其中一些细胞很容易被哺乳动物病毒感染。

除这些永生细胞系外，病毒也可以在恒河猴的猴肾细胞系中生长。猴肾细胞系称为原始细胞系，因为这种细胞在实验室条件下不能通过连续传代来保存。原始猴肾细胞可供许多病毒生长，因此，对未知病毒的最初分离来说是很有价值的细胞系。

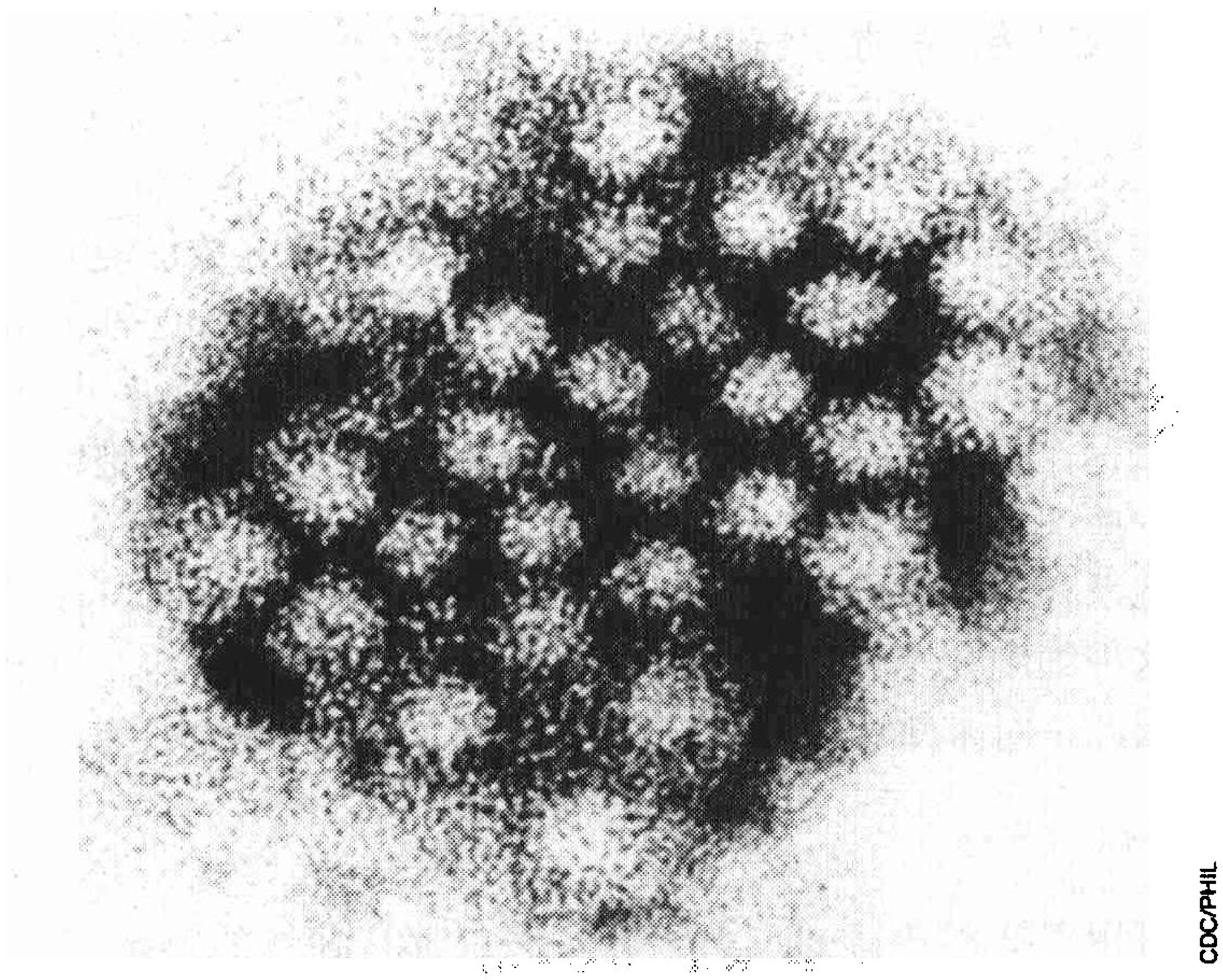
电子显微镜

电子显微镜也可用于病毒的诊断。由于许多病毒都有独特的形态特征（第 9 章），通过在电镜下观察可以确定临床样品中有无病毒存在（图 24.30）。在大多数标本中，病毒颗粒首先必须从人的组织中分离出来并进行浓缩，在各种浓缩技术中，通常使用离心和过滤来获得含有足够数量的病毒颗粒样品。虽然人体组织中病毒颗粒的特异形态的电镜观察没有免疫学试验和核酸探针法那样准确可靠，但它常可以作为对疾病的推定证据。

用预先制备好的抗特殊病毒的抗体处理样品可以提高本方法的灵敏度和特异性；这种抗体可以引起病毒颗粒凝集，这使它们在电镜下很容易从细胞碎片中区别出来。也可通过用连接有重金属的抗病毒抗体处理标本，使病毒肉眼可见（见 24.9 节）。应用负染技术（图 24.30），采样后 20min 由电镜分析出结果是可以做到的，然而，这种方法需要昂贵、复杂的分析工具——电子显微镜。



(a)



(b)

图 24.30　检测病毒的临床标本的电镜照片。(a) 从粪便样品中获得的人轮状病毒（rotavirus)。在粪便中呈典型的球状，这是它的诊断标准。每个病毒的直径大约为 75nm。(b) 来源于痢疾患者的人类诺沃克病毒（norwalk-like virus)，每个病毒颗粒的模糊粗糙的边缘与诺沃克因子很像，病毒直径大约为 27nm。

其他病毒诊断试验

诊断病毒学中常用的几个实验室操作总结在表 24.10 中。对常规病毒感染，可以通过免疫诊断法（见 24.5 节～24.12 节）和核酸探针法（见 24.13 节）来诊断。

表 24.10　诊断病毒学的实验室操作程序[a]

疾病	可能感染的病毒	样品来源	细胞系/观测技术
上呼吸道感染	鼻病毒 冠状病毒 腺病毒	鼻咽或气管分泌物（吸取）	人成纤维细胞培养物
肺炎	流感病毒	鼻咽分泌物或粘取	人成纤维细胞培养物或鸡胚
麻疹	麻疹病毒	鼻咽分泌物或粘取	猴肾细胞
水疱疹	单纯疱疹病毒	穿刺吸取水疱液	人成纤维细胞培养物
痢疾	轮状病毒（婴儿）、类诺沃克病毒	粪便或直肠粘取物	利用电镜观察病毒颗粒特征（图 24.30）
非细菌性脑膜炎	肠道病毒 流行性腮腺炎病毒 单纯疱疹病毒	脊髓液	人成纤维细胞培养物或猴肾细胞

a. 免疫学和核酸探针检测方法广泛应用于病毒感染疾病的临床诊断（见 24.5～24.12 节）。在科研中，上面列出的这些方法常用来初步分离和鉴定具有感染性的病毒。

许多免疫学诊断方法，无论是用于检测病毒颗粒的酶联免疫吸附测定（ELISA）（见 24.11 节和图 24.24）还是应用病毒特异性荧光抗体检测法，都可用于检测细胞是否感染了病毒（见 24.10 节和图 24.24）。在间接检测方法中，并不能直接检测到病毒而是根据病毒特异性抗体推测是否受到病毒感染。比如，对人类免疫缺陷病毒（HIV）感染的常规检测就包括 ELISA 和免疫斑点实验（见 24.10 节和 24.11 节），这两种方法都是检测 HIV 抗体的存在，而不是检测 HIV 本身；然而，在 26.15 节中讨论的病毒负载试验是用来直接检测 HIV 病毒存在的。免疫凝集试验也可直接检测病毒，固定在乳胶或活性炭上的病毒抗体可以使从裂解的组织样本中释放出来的病毒颗粒产生凝集反应（见 24.8 节）。

核酸探针和 PCR 检测也是检测和鉴定具有重要临床意义病毒的主要诊断手段（见 24.11 节和表 24.9）。

大多病毒诊断程序都必须在特定的环境下应用。对常规病毒感染，可以根据临床症状进行诊断。由于能够承担多数病毒诊断中需要的专业技术（例如，进行病毒初始培养的实验室必须具有或购买恒河猴肾细胞系，并且还得具有专业的细胞培养技术）和费用的病毒学诊断实验室只设在特殊的政府标准制定实验室或重要的研究机构。

概念检查

病毒只能在组织中进行体外培养繁殖。因此，大多数病毒诊断技术不是依赖生长而是常规的免疫实验和核酸杂交技术。电子显微镜技术对于直接观察宿主样品中病毒是很有用的。

◆ 为什么绝大多数病毒只在组织培养基中生长？

◆ 在实验室中怎样鉴定致病病毒？

复习题

1. 叙述从喉咙分泌物和血样中得到和培养细菌的标准过程。取血样时要特别注意什么？（见 24.1 节）
2. 为什么从尿样中总能培养出细菌？为什么尿样中的细菌数量比较多？什么细菌容易引起尿道感染？为什么？（见 24.1 节）
3. 叙述厌氧菌的培养程序。为什么快速处理临床样品是很重要的？对分离和培养厌氧菌来说，必须有什么样的特殊步骤和预防措施？（见 24.1 节）
4. 区分分离和鉴别培养基之间的区别。伊红美蓝琼脂培养基是分离还是鉴别培养基？在临床实验室为什么经常用到它？（见 24.2 节）
5. 叙述测定抗生素敏感性的 Kirby-Bauter 试验。为什么由患者分离来的潜在病原体必须做此试验？（见 24.3 节）
6. 实验室感染是如何引起的？为了避免实验室感染，需要注意什么？（见 24.4 节）
7. 为什么感染后抗体的效价会上升？较高的抗体效价是否机体正在受到感染？为检测感染为什么需要取 2 个血清品？（见 24.5 节）
8. 单克隆抗体的制备与多克隆抗体相比有什么优点？特别是关于抗体的标准化生产方面。（见 24.6 节）
9. 以微生物毒素和抗血清为例说明中和作用。（见 24.7 节）
10. 在临床诊断上为什么凝集反应比沉淀反应应用更广泛？（见 24.8 节）
11. 如何用荧光抗体诊断病毒病？荧光抗体和未标记的抗体相比有哪些优点？（见 24.9 节）
12. 放射免疫试验和酶联免疫吸附测定与凝集反应相比是极其灵敏的，为什么？（见 24.10 节）
13. 为什么免疫印迹（Western blot）实验通常用来确定人类免疫缺陷病毒-ELISA 的阳性结果？（见 24.11 节）
14. 对设计一个病原体特异性核酸探针来说，什么信息资料是最重要的？在哪里可以得到这样的信息？这种信息对所有病原体都适用吗？（见 24.12 节）
15. 什么是原始细胞系？为什么动物病毒只能在组织培养基上生长？（见 24.12 节）

应用题

1. 从血液培养中，你得到一个金黄色葡萄球菌培养物。说明并解释这可能是患者感染了金黄色葡萄球菌吗？列出可能性和问题，和值班医师进行讨论。为了确定这种微生物还需要做什么工作？
2. 从短期和长期结果考虑，在分离可疑病原体之前，为什么不应该用常用药物抗生素处理感染性疾病？在分离和鉴定病原体后，为了确定合适抗生素敏感性，还需要做什么工作？为什么在医院环境以外很少采取这些措施？
3. 解释分别在急性感染期和两周后收集患者血清的原理（见 24.5 节）。你想从痊愈患

者的血清中得到什么信息?

4. 快速诊断系统如凝集反应试验、基于免疫反应的 ELISA 试验，和生长依赖性诊断程序相比有什么优点? 不以培养物为基础的快速试验的潜在缺陷是什么?
5. 在诊断微生物学中，应用 DNA 探针的主要优点是什么? 设计序列特异性聚合酶链反应（PCR）探针，需要了解微生物的哪些信息? 从哪里可以得到这些信息?
6. 设计一个用来分离和鉴定一种新型病毒病原体的方案。注意要包括生长依赖性分析方法、分子分析方法和可视分析方法如电子显微镜。你将在哪里报告你的发现? 你设计的哪种方法可以发展为用于该病毒快速临床诊断的常规、高通量检测方法?

（李国强 译，张心平 校）

第五部分

微生物疾病

25

流行病学



严重急性呼吸系统综合征（SARS），是一种新型的呼吸系统疾病。照片中显示的SARS冠状病毒是引起这种呼吸系统传染病的病原体。

词汇表

急性（acute）：短期感染，通常是以剧烈发作为特征

生物战（biological warfare）：用生物制剂使人失去战斗力或被杀

携带者（carrier）：无临床症状，但可传播疾病的感染个体

疾病控制预防中心（centers for Disease Control and Prevention）（CDC）：美国公共健康服务机构。监测疾病动向，向社会和健康护理专家提供疾病信息，是疾病预防和治疗监督的公共机构

慢性（chronic）：长期感染

共源流行（common-source epidemic）：单一污染源感染大多数人，引起的流行

新出现感染（emerging infection）：在过去 20 年中，不断发生的传染病或在不久将来其威胁会上升的传染病

地方流行（endemic）：疾病一直存在，但通常发病率低

流行病（epidemic）：疾病限于某个地区，具有高发病率

流行病学（epidemiology）：研究传染病的发展、分布和控制

病媒（fomite）：由活病原污染的非生物体，它能将病原转移到宿主

群体免疫（herd immunity）：由于群体高比例的免疫，使群体对病原具有抵抗性

宿主间的传染（host-to-host epidemic）：由人与人间的接触而传染，以病例的逐渐增加和减少为特征

发病率（incidence）：群体中的病例数

致病率（morbidity）：群体中的发病患者数

死亡率（mortality）：群体中的死亡人数

医院感染（nosocomial infection）：医院获得性传染

暴发（outbreak）：在短时间内有大量病例产生

大流行（pandemic）：世界范围内流行

流行（prevalence）：群体中患病者的比例或百分数

公共健康（public health）：以群体作为整体的健康状况考察

隔离（quarantine）：为防止疾病传播，限制具有传染性、严重感染性个体的行动

复发性传染病（reemerging infection）：已人为控制的传染病，又重新出现。

栖居地（reservoir）：活传染源生存的区域，个体在此区域被感染

监控（surveillance）：当疾病发生时，观察、确认、报告的过程

载体（vector）：传播病原体的活介质（在第 31 章中，注意它的另一个用法）

媒介物（vehicle）：使很多个体感染的非生命病原物质，常见的媒介物是食物和水

人畜共患病（zoonosis）：首发于动物，但又可传染给人类的疾病

Ⅰ 流行病学原理

处于流行性群体中的个体通常会被传染性疾病感染。在这里我们讨论病原体是如何传播的。流行病学（epidemiology）是研究人群中疾病的发生、传播和控制的科学，因此，它与公共健康（public health）相关。在下面 4 章中，我们将研究疾病的本质。这里我们先来了解一下流行病学原理和控制传染性疾病的重要性。

发达国家在控制传染性疾病方面是很成功的。图 1.7 显示了美国现在和 20 世纪初死亡原因的比较数据。在大多数发达国家中，微生物引起疾病的死亡率要低于非传染性疾病。然而在全球范围内，估计在每年死亡的 5600 万人口中有 30%死于传染病，并且传染病仍是发展中国家严重的公共健康问题。同时在发达国家，新的传染性疾病，如严重急性呼吸系统综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS）也频繁出现。另外，以前已经得到控制的疾病，如肺结核也再度出现。在美国，死于传染病的人数正在增加（图 25.1）。能否有效地控制传染性疾病，仍然是整个世界面临的挑战，需要科技、医药、经济、政治和教育的支持。

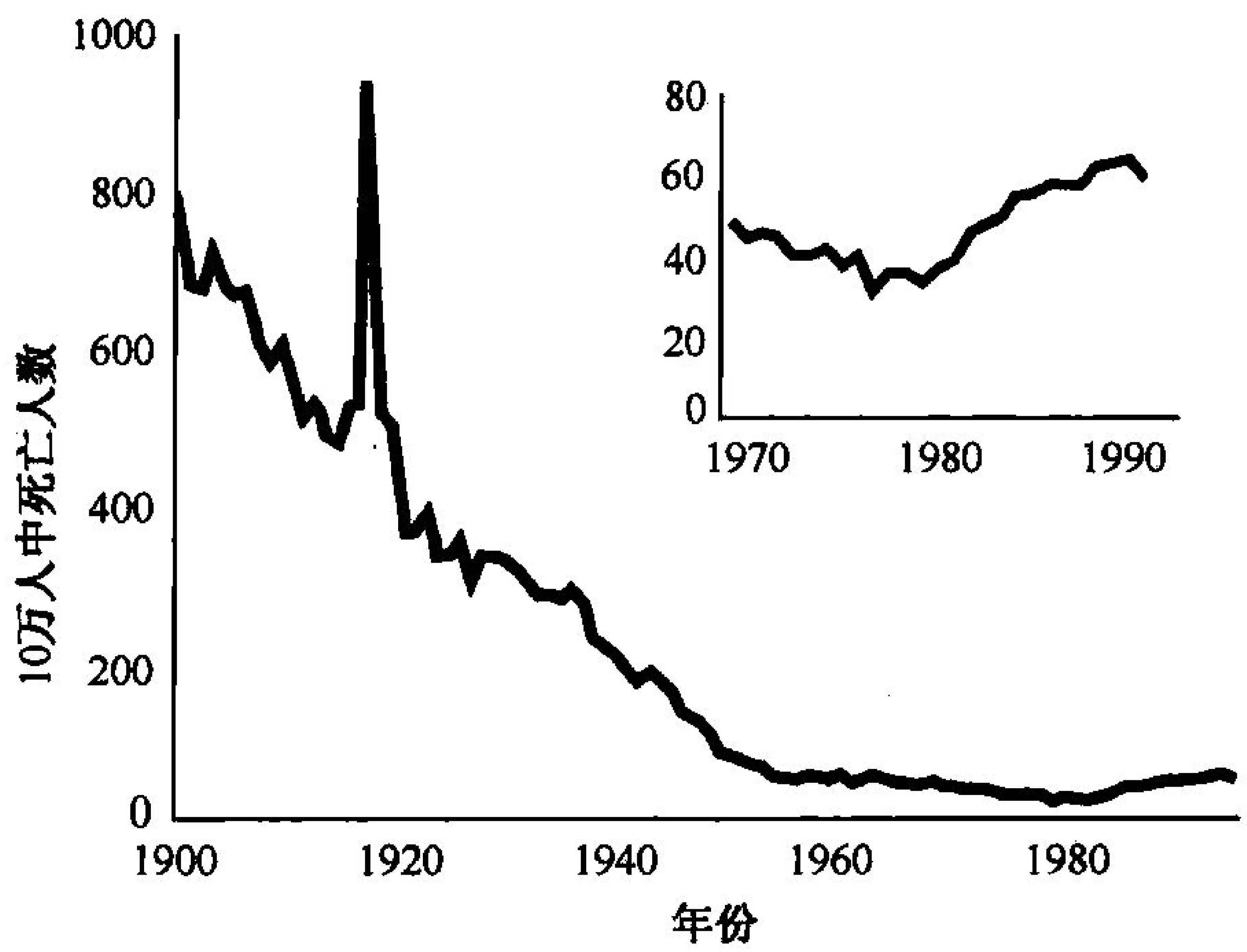


图 25.1 美国传染性疾病引起的死亡。虽然传染性疾病的死亡率在整个 20 世纪保持稳定下降（除了 1918～1919 年流行性感冒引起的大规模死亡）。但是从 1980 年开始，死亡率明显增加。摘自 Hughes J M. 2001. *Emerg Infect Dis* 17: 494～496。

25.1 流行病学

病原体必须在宿主体内生长繁殖，才能引起疾病。因此，流行病学家都致力于研究病原体的生活史。在许多情况下，病原体不能脱离宿主而生存，宿主一旦死亡，病原体也就随之死亡。如果病原体在侵入新宿主前就杀死原宿主，它们就会绝迹。因为病原体杀死了宿主，它们也无法继续存活。

一个具有良好适应性的病原体，实际上是与宿主平衡共存的，它们只从宿主中获取生存所需，对宿主仅有很小的伤害。这种病原体可引起慢性（chronic）或者长期的感

染，当宿主和病原体间达成平衡时，它们都可以生存下来。但是，在宿主尚未对新的病原体产生抵抗力或因饮食失衡、衰老及其他一些不利因素引起宿主抵抗力下降时，病原体对宿主的严重伤害就会产生（见 21.13 节）。在宿主的进化中，病原体是一个选择压力；同样，在病原体的进化中，宿主也是选择压力。病原体通常引起急性（acute）感染，其特点为发病迅速来势凶猛，但康复也快。

当病原体不依赖宿主生存时，就可引起破坏性疾病。例如，土壤中常见的梭菌属（*Clostridium*）生物（见 12.20 节）偶尔会成为人体病原体，可以引起如破伤风和肉毒中毒等疾病（见 21.10 节、27.9 节和 29.6 节）。

流行病学家跟踪着疾病的传播，以确定疾病的起源和传播方式。他们主要依靠临床研究、疾病调查报告、保险问卷以及通过访问患者确定引发疾病的普遍原因等方式来获得流行病学数据。这不同于以治疗疾病和照顾患者为主的临床治疗及实验室疾病研究。疾病的临床和生态学研究对于有效地控制疾病、维护公共健康是非常重要的。

概念检查

流行病学是研究疾病在人群中的传播。流行病学家通过研究病原体与宿主群体间的相互关系来了解传染性疾病。

- ◆ 流行病学家与微生物学家有何不同？
- ◆ 为什么流行病学家要在人群中获得传染性疾病的数据？

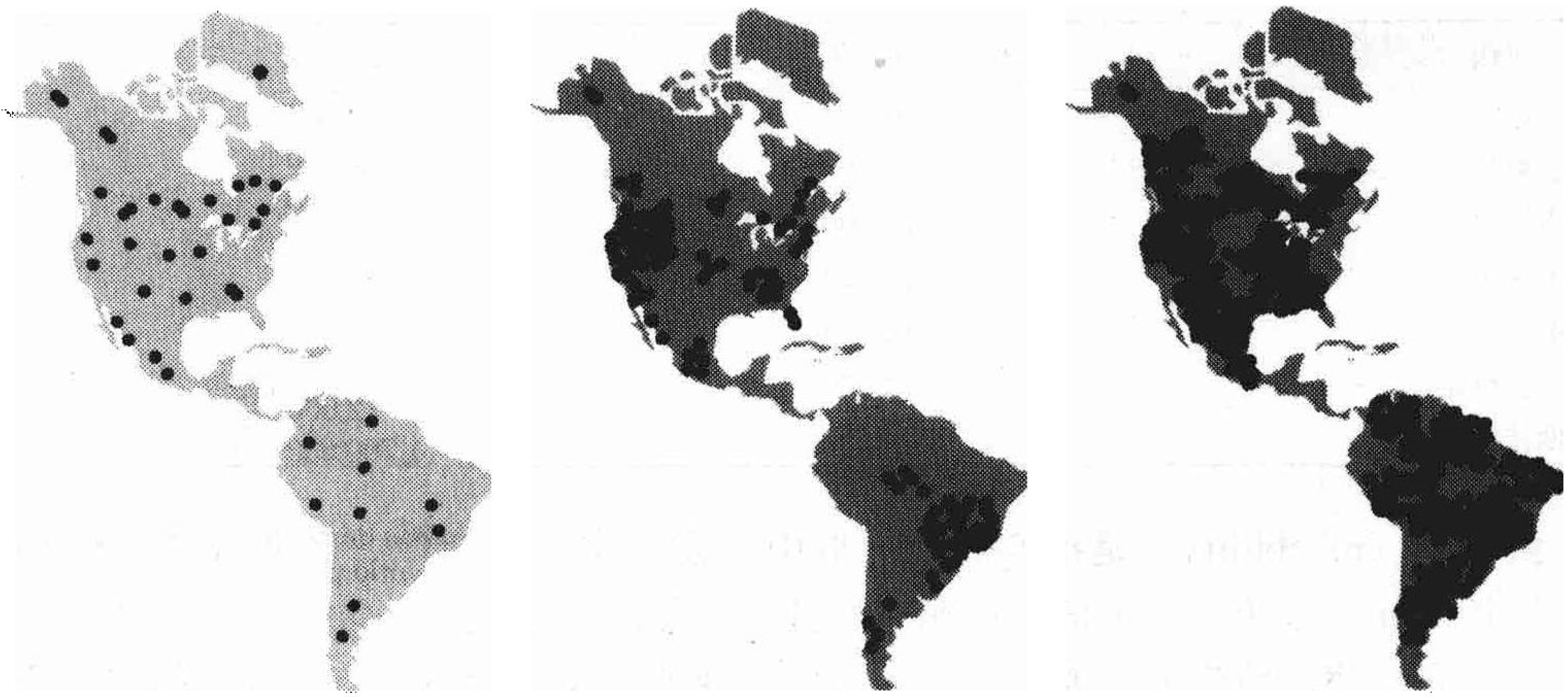
25.2 流行病学术语

流行病学家定义了一些具有特定含意的术语。在某个时间，人群中患病个体的比例（百分比）定义为人群中该疾病的流行（prevalence）。疾病的发病率（incidence）是指危险人群中患病个体的数目。我们说疾病流行，是指在同一时间内，一个群体中，患该疾病的个体数极迅速的增加。大流行（pandemic）是指广泛分布的流行性疾病（图 25.2）。相反，地方流行（endemic）是指经常存在，而且在某一人群中，通常为低发生率的类型。在地方流行疾病中，病原体毒力不高，个体中的大部分对其疾病具有免疫力，因此，发病率较低。但是，只要地方流行状况持续，一些个体就会一直是感染源的携带者。

散在性疾病的个体病例记载着地理上分隔的区域，即不同地区发生率不相关。另一方面，疾病的暴发（outbreak）是指先前只有散在性疾病发生记录的地区，在相当短时间内具有高发病率。最后一个术语是亚临床症状感染（subclinical infection），可用来描述那些没有或只有很弱临床症状的患者。亚临床症状感染的患者通常是该病的携带者（carrier），因为他们虽然没有或只有很弱的某些症状，但他们仍然是活跃的携带者和保护病原的因素（见 25.3 节）。

死亡率与致病率

发病和死亡的统计分析可以反映疾病的发生和流行状况。从中也可看得到公共健康



(a) 地方性疾病　(b) 流行性疾病　(c) 大流行病

图 25.2 根据发生率分类的疾病。每个点代表了一种特殊疾病的分布状况。地方性疾病，通常出现在图中所显示地理区域的人群中。流行性疾病，在很大范围内显示出高发生率，但通常起源于地方性流行病区域。大流行病在世界范围内广泛分布。如流感在一些特定地区为地方性病，但在合适环境如人口拥挤时，经常发展成为大流行病；另外流感还可由季节性流行病发展成为全球大流行病。

的概况。统计的人群范围可以大至全球，小至一个国家或地域。公共健康状况随时间、地区的不同而各具差异。因此，某一特定时刻公共健康状况的评估只是对情况的瞬间反映。通过多年的跟踪统计，才可能评估不同公共健康政策对疾病发生率的影响。

死亡率（mortality）是指人群中死亡的概率。在 1900 年，发达国家的主要死因是传染病（图 1.7）。但目前传染病的影响很小，非传染病如心脏病和癌症却占了较大比重。然而，如果公共健康措施被破坏，现在的状况会有迅速的改变。不过在发展中国家，传染病仍是主要的致死因素（见 25.10 节和表 25.1）。

表 25.1 世界范围内死于各种传染疾病的人数，2002 年

疾病	死亡人数	致病因素
急性呼吸感染	3 963 000	细菌、病毒、真菌
获得性免疫缺陷综合征（AIDS）	2 777 000	病毒
腹泻疾病	1 798 000	细菌，病毒
矽肺结核	1 566 000	细菌
疟疾	1 272 000	原生动物
麻疹	611 000	病毒
百日咳	294 000	细菌
破伤风	214 000	细菌
脑膜炎	173 000	细菌
肝炎（所有类型）	157 000	病毒
梅毒	153 000	细菌
黑热病	51 000	原生动物
锥虫病（昏睡病）	48 000	原生动物

续表

疾病	死亡人数	致病因素
衣原体	16 000	细菌
血吸虫病	15 000	寄生蠕虫
查格斯病	14 000	寄生蠕虫
日本脑炎	14 000	病毒
登革热	13 000	病毒
肠线虫感染	12 000	寄生蠕虫
其他传染病	1 700 000	各种病原体

致病率（morbidity）是指疾病在人群中的发生率，包括致死和非致死性疾病。致病率统计比死亡率统计更准确地说明人群的健康状况，这是由于许多影响健康的疾病具有较低的死亡率。致病的主要原因与致死的主要原因是截然不同的。致病的主要原因有急性呼吸系统疾病（如感冒）和急性消化系统疾病，这些疾病都是由传染源引起的，在发达国家很少会导致死亡。

疾病的过程

在临床症状上，典型的传染病可分为以下几个阶段：

1. 感染：有机体在宿主体内生长。

2. 潜伏期：感染期和出现症状之间的时期。有的疾病，如流感（见 26.8 节），潜伏期以天计算，较短；而 AIDS 等疾病以年计算，具有较长的潜伏期（见 26.14 节）。疾病的潜伏期长短取决于下列因素：接种量、病原体的毒力、宿主的抵抗力、侵入位点到感染位点的距离（见 21.6 节、21.7 节和 21.8 节）。在潜伏期结束时，最先出现的症状是头痛和一系列不适感。

3. 急性期：疾病达到了高潮，症状随之出现，如发烧和寒战。

4. 减缓期：症状有所减轻，体温下降、多汗，感觉良好。这一时期可能很短（1天），这种状况称为骤退；也可以持续几天，称为溶解。

5. 恢复期：患者体力恢复，完好如常。在这一过程的后期，宿主的免疫能力大为增加，通常病后，会完全康复并产生活跃的免疫能力。

概念检查

地方性疾病在特异性群体中通常具较低的发生率，而流行性疾病在特殊人群中发生率较高。传染性疾病可引起发病也可引起致死。一个传染性疾病在宿主内具有特定的临床症状。

◆ 区别地方性疾病、流行性疾病和大流行病。

◆ 区别致病率和死亡率。为什么引起宿主高致病率可能对病原体更有利？宿主致死性对病原体有利吗？

25.3 疾病栖居地和流行病

栖居地是指活传染源生存的区域，个体在此区域被感染，该区域可以是生物或非生物环境。表 25.2 列出了一些常见的人类疾病和它们的栖居地。有的病原体营腐生生活（在死的物质上生存），其致病性是偶然的。例如，破伤风梭菌（*Clostridium tetani*；破伤风致病因子），正常情况下栖居于土壤中，只是偶然引起动物感染。因为感染宿主并不是其生存的必要条件，所以即使没有易感性宿主，破伤风梭菌也能在自然界中生存。

表 25.2 流行病：病原体、根源、栖居地及其控制

疾病	病原体[a]	根源	栖居地	控制方法
共源性流行[b]				
炭疽	*Bacillus anthracis* 炭疽芽孢杆菌（B）	来自感染动物的奶或肉	牛，猪，山羊，绵羊，马，人	消灭感染动物
细菌性痢疾	*Shigella dysenteriae* 痢疾志贺氏菌（B）	食物和水被粪便污染	人	鉴定、控制携带者，对食品操作者的监管，净化水源
肉毒中毒	*Clostridium botulinum* 肉毒梭菌（B）	食物被土壤污染	土壤	适当的食物保藏
布鲁氏菌病	*Brucella melitensis* 马尔他布鲁氏菌（B）	来自感染动物的奶或肉	牛，猪，山羊，绵羊，马	牛奶低热灭菌，控制动物感染
霍乱	*Vibrioqd cholerae* 霍乱弧菌（B）	食物和水被粪便污染	人	公共水源净化，疫苗
大肠杆菌 O157：H7感染	*Escherichia coli* O157：H7 大肠杆菌 O157：H7（B）	食物和水被粪便污染	人，牛	公共水源净化，对食品操作者的监管，对饮料低热灭菌
贾弟虫病	*Giardia* spp. 贾弟虫（P）	水被粪便污染	野生哺乳动物	公共水源的净化
肝炎	肝炎 A，B，C，D，E（V）	感染的人	人	对污染液和污染物的净化，如果可行（仅是 A 和 B），注射疫苗
军团病	*Legionella pneumophila* 嗜肺军团菌（B）	污染的水	高湿度的环境	净化空调制冷装置等
副伤寒	*Salmonella paratyphi* 副伤寒沙门氏菌（B）	食物和水被粪便污染	人	公共水源净化，食品操作人员管理，疫苗
伤寒	*Salmonella typhi* 伤寒沙门氏菌（B）	食物和水被粪便污染	人	公共水源净化，食品操作人员管理，牛奶低热灭菌，疫苗
宿主间流行呼吸道疾病				
白喉	*Corynebacterium diphtheriae* 白喉棒杆菌（B）	患者和携带者，感染的食物和污染物	人	疫苗，感染个体的检疫
敌坦病毒属	Hantavirus 敌坦病毒（V）	污染粪便的摄入	啮齿动物	控制啮齿动物的量和避免接触
出血热	Ebola virus 埃博拉病毒（V）	污染的体液	不明	对活性病例检疫
脑膜炎	*Neisseria meningitidis* 脑膜炎奈瑟氏球菌（B）	患者和携带者	人	对易感菌株用磺胺嘧啶处理
肺炎球菌性肺炎	*Streptococcus pneumoniae* 肺炎链球菌（B）	患者	人	使用抗生素，与传染期的患者隔离
结核	*Mycobacterium taberculosis* 结核分枝杆菌（B）	来自患者的痰，污染的牛奶	人，牛	用异烟肼处理，牛奶低热灭菌

续表

疾病	病原体[a]	根源	栖居地	控制方法
宿主间流行呼吸道疾病				
百日咳	*Bordetella pertussis* 百日咳博德特氏菌（B）	患者	人	疫苗，患者隔离
德国麻疹	Rubella 病毒（V）	患者	人	疫苗，避免感染个体与孕妇接触
流感	influenza virus 流感病毒（V）	患者	人，动物	疫苗（仅在某种情况下推荐使用）
麻疹	measles virus 麻疹病毒（V）	患者	人	疫苗
性传染疾病[c]				
获得性免疫缺陷综合征（AIDS）	human immunodeficiency virus 人类免疫缺陷病毒（V）	感染体液，尤其是血液和精子	人	同病毒复制因子治疗（不可愈，见 26.14 节）
衣原体病	*Chlamydia trachomatis* 沙眼衣原体（B）	尿道、阴道和肛门的分泌物	人	对人骨盆常规检查时，检验该有机体，对携带者及可能感染者进行化疗，并进行病例跟踪和处理
淋病	*Neisseria gonorrhoeae* 淋病奈瑟氏球菌（B）	尿道、阴道分泌物	人	对携带者及可能感染者进行化疗，并进行病例跟踪和处理
梅毒	*Treponema palldum* 苍白密螺旋体（B）	感染浸出物或血液	人	血清学鉴定，对血清反应阳性个体的抗生素治疗
滴虫病	*Trichomonas vaginalis* 阴道毛滴虫（P）	尿道、阴道和前列腺分泌物	人	对携带者及可能感染者进行化疗
载体传播疾病				
流行性斑疹伤寒症	*Rickettsea prowazekii* 普氏立克次氏体（B）	感染虱子的咬伤	人、虱子	控制虱子数量
莱姆氏症	*Borrelia burgdorferi* 布氏疏螺旋体（B）	感染蜱咬伤	啮齿动物，鹿，蜱	避免与蜱接触，用抗生素治疗感染个体
疟疾	*Plasmodium* spp. 疟原虫（P）	按蚊咬伤	人、蚊	控制蚊子的数量，用抗疟药物治疗感染者
鼠疫	*Yersinia pestis* 耶尔森氏菌鼠疫菌（B）	跳蚤咬伤	野生啮齿动物	控制啮齿动物数量
落基山斑疹热	*Rickettsia rickettsii* 立氏立克次氏体（B）	感染蜱咬伤	蜱、兔、鼠	避免与蜱接触，用抗生素治疗感染个体
直接接触传染疾病				
鹦鹉热	*Chlamydia psittaci* 鹦鹉热衣原体（B）	与鸟或鸟的排泄物接触	野生或家养鸟	避免与鸟接触，用抗生素处理感染个体
狂犬病	Rabies 病毒（V）	食肉动物咬伤	野生和家养食肉动物	避免动物咬伤，给动物饲养者和接触动物者注射疫苗
野兔病	*Franciscella tularensis* 土拉热弗朗西斯氏菌（B）	与兔子接触	兔	避免与兔接触，用抗生素处理感染个体

a. B，细胞；V，病毒；P，原生动物。
b. 一些共源疾病不能在宿主间传播。
c. 性传染病可以通过安全套和节制性欲来有效控制。

然而，许多病原体仅以生物体为其栖居地。在这种情况下，对宿主的感染是病原体生命循环的必要环节。有些病原体只能侵染人类，它们的生存周期是和人与人之间的传染相关的（第 26 章）。这类常见的有呼吸系统病毒和细菌病原体、性传播病原体、葡萄球菌和链球菌、白喉、伤寒和流行性腮腺炎。正如我们将要看到的，只依靠单一宿主进行整个生命循环的病原体是可以被根除的（见 25.8 节）。

人畜共患病

有的传染病发生于人和动物。源于动物的传染病，偶然传染给人类的病称为人畜共患病（zoonosis）。因为对动物采取的公共卫生措施较少，故感染率较高。这类病原体在自然界中的生存主要依赖于动物之间的感染，从动物到人的传染只是偶然发生的，且人与人之间的传染较为少见（见 25.8 节）。因此，仅在人群中控制人畜共患病是绝不可能消除该疾病，所以这是一个公共卫生的问题。

一般仅通过在动物宿留地消除传染病，就能有效地根除人畜共患病。这是因为病原体在自然界主要依靠动物到动物的方式传播，而人类是偶然的非必需宿主。例如，瘟疫（见 27.7 节）是啮齿类动物中常见的疾病，控制被感染的啮齿类动物的数量及瘟疫传播的媒介，远比给感染的人注射疫苗等措施更有效。从家畜传给人的牛结核病是一种不同于人结核病的疾病（见 26.5 节），对这种疾病的成功防治，主要是通过确认和消灭感染动物来实现的。因为牛奶是主要的传播载体，故对牛奶的巴斯德灭菌也是行之有效的防止牛结核病从牛到人传染的有效方法。

一些特殊的传染性疾病，特别是那些由原生动物引起的疾病，具有更复杂的循环，包括从动物到人再到动物的传播（如疟疾，见 27.5 节）。这种情况下，可以在人也可以在动物宿主阶段对该疾病加以控制。

携带者

携带者（carrier）是指那些无明显临床症状的感染个体。他们是潜在的感染源，这对于疾病的传播是很重要的。携带者可能是处于潜伏期的个体，即将成为具有急性症状的感染者，这类携带者是呼吸性疾病的主要感染源。因为他们未能意识到感染，所以也就未采取任何措施防止传染给他人。由于携带状态只是很短的时间，故称为急性携带者。从公共健康观点看，慢性携带者可长期处于感染状态，携带疾病，通常表面上看很健康，但实际上，他们或是临床症状痊愈但仍携带活病原的个体，或是无明显临床症状感染的个体。

使用一些诊断技术可将携带者从人群中确定出来，如培养观察（见 24.1 节）或血清学（抗体）诊断（见 24.5 节）。例如，使用结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）抗原，测定迟发超敏反应（暴露过、先前感染过或正在感染）的实验已被广泛应用于确定携带者（见 22.15 节和 26.5 节）。携带者还对其他疾病如肝炎（见 26.11 节）和伤寒（见 29.7 节）的传播至关重要。人们有时利用培养观察或血清学诊断的方法对食品制造者和医护人员进行检查，以杜绝他们成为普通传染源的危险。

慢性携带者的典型例子是著名的“伤寒 Mary”，她是纽约市 20 世纪早期的一个厨师。伤寒 Mary（她的真实姓名 Mary Mallon），1906 年在其患有伤寒病时被聘请作厨

师。据调查，伤寒的大规模暴发都与 Mary 有关。她很可能是这个传染病的根源，因为她的排泄物中含有大量的伤寒细菌，即伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhi*）。她的一生始终是病菌的携带者，她的胆囊首先受到感染，然后从胆囊分泌到肠道。Mary 拒绝摘除胆囊而被监禁，在她承诺不再为他人烹调后将她释放，接着她就消失了，隐姓埋名，继续在餐馆和公共场所当厨师，最终导致了伤寒流行病的大规模暴发。几年后她又被监禁，直到 1938 年去世。

概念检查

认识病原体的栖息地对理解传染病的形成至关重要。一些病原体存在于土壤、水或者动物体中。其他一些病原体仅存在于人体，并且只能通过人与人之间的接触而传染。了解疾病携带者和病原体的生活史对控制疾病至关重要。

◆ 什么是疾病栖居地?

◆ 区分急性和慢性携带者，并各举一例。

25.4 传染病的传播

流行病学家通过对某些疾病所在地域、季节及年龄组分布状况的跟踪，得出了相应的分布模式，从而调查出这些疾病的发生率。局限在某一地区发生的传染病，总是有其特定的载体，如伤寒是由热带地区的蚊子传播的。特定季节发生的疫病总是具有其特定的传播方式，如流感总是集中发生于儿童入学后与频繁接触时。

不同病原体具有不同的传播方式，这通常是与它所在的机体生存环境有关，如呼吸系统病原体常存在于空气中；而消化系统病原体大多通过食物和水传播。病原体的生存必须依靠宿主间的传播。环境因子对病原体的生存也具有影响，如天气的变化会影响宿主与病原体的接触。例如，加利福尼亚脑炎是由单链 RNA Bunyaviruses 病毒引起的（见 16.9 节），通常发生在夏秋季节，每到冬季就消失，具有非常规律的生活周期（图 25.3）。由于病毒是由蚊子传播的，因此在温暖季节流行。当昆虫载体消失后，疾病也就消失，直到夏季载体重新出现时病毒才得以再次传播。实际上所有依靠蚊子传播的脑炎病毒都遵循这样的季节规律。

病原体可根据其传播机制分类，所有机制都有几个共同阶段：①脱离宿主；②传播；③进入新宿主。这里我们只简单介绍常见病原体的传播机制。

宿主间的直接传播

宿主之间的直接传播发生于感染者与易感受体接触时（见第 26 章）。常见的有呼吸系统传染和直接接触。感冒和流感这类上呼吸道感染是通过微小的传染颗粒传播的。但极易受环境影响的病原体不能长时间的停留在体外，必须通过宿主间的直接接触传播。最好的例子是那些性传播疾病［如苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*，称梅毒）和淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*，淋病）］。这些病原体对干燥极为敏感，以至于片刻不能离开机体。只有靠人体间的紧密接触及体液交换，如性交，才能使这类病原

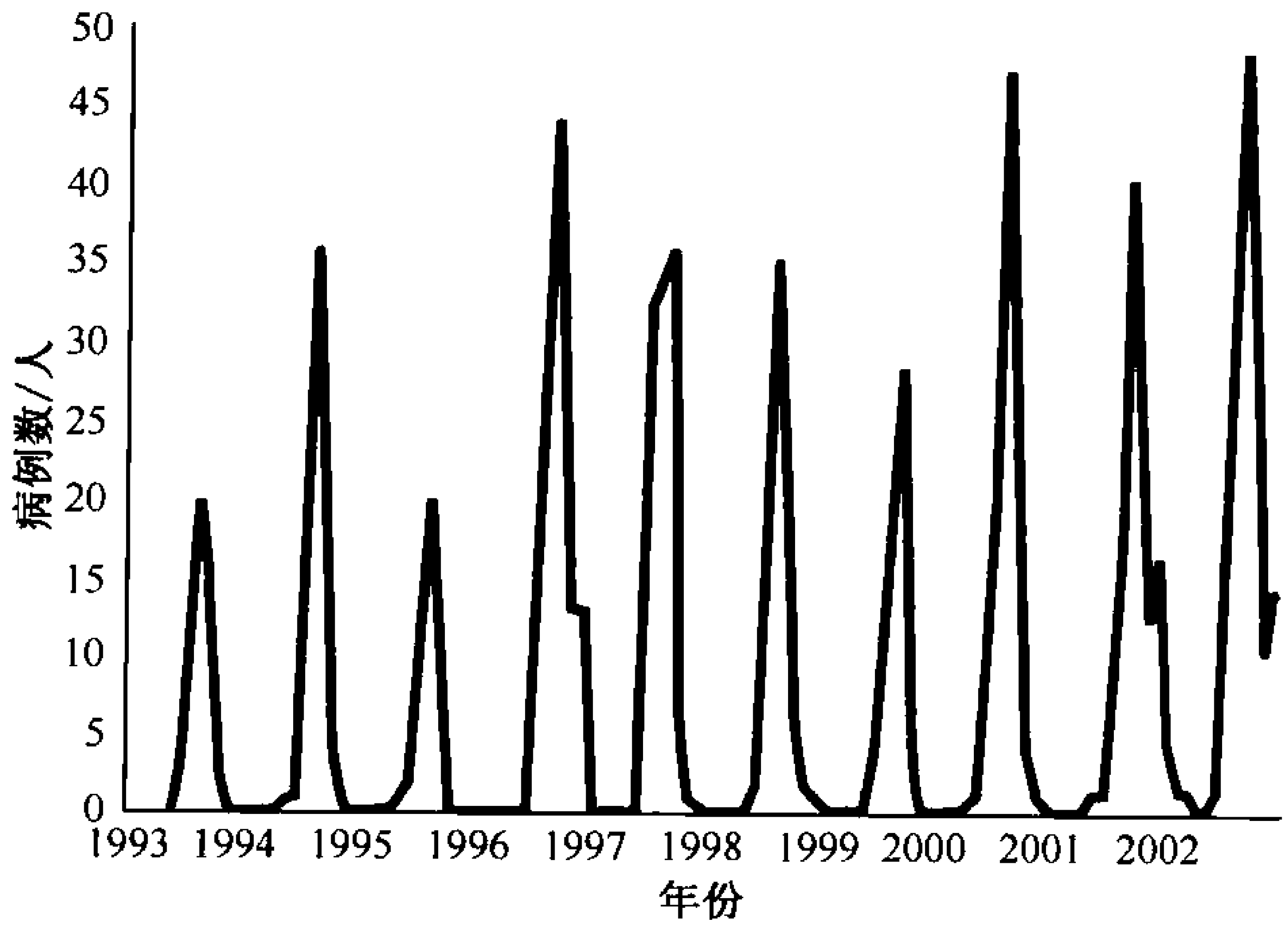


图 25.3　在美国加利福尼亚脑炎按月份的发生率。在夏末，出现显著增高的发生率，在每个冬季则几乎完全消失。疾病随着蚊子载体的流行而每年以固定周期循环。2002 年 16 个州有病例 167 起。在美国其他依靠蚊子传播的人类病毒性疾病也具有相似的季节性。其中包括西部马脑炎、东部马脑炎、St. Louis 脑炎和西尼罗河脑炎。数据来自 Atlanta，GA，USA 疾病防控中心。

体传播。

葡萄球菌（疖和丘疹）和真菌（环癣）引起的皮肤传染也与直接接触有关，但这些病原体具有相对较强的抵抗干燥等不良环境的能力。而且直接接触并不是它们传播的唯一方式。许多呼吸系统病原体通过咳嗽或打喷嚏产生的飞沫引起传染，也是直接传播；但这些颗粒不能长期存在于空气中。因此，尽管传播不见得是紧密的人与人接触，但需要近距离。

宿主间的间接传播

间接传染可通过生物或非生物的途径传播。传播病原体的生物因子称为载体，它们多为节肢动物（昆虫、螨、扁虱和蚤）或脊椎动物（狗、猫和啮齿类；第 27 章）。节肢动物本身可以不是宿主，只是传播者。大量节肢动物通过吸血获得营养，当病原体存在于原宿主血液中时，它们就可以吸入并转移病原体。有时，病原体可在节肢动物体内繁殖，此时节肢动物称为选择性宿主。这种繁殖加大了病原体的量，进而增加了它在下一次吸血时传播病原体的可能性。

非生物因子如床上用品、玩具、书、外科手术器材等，可传播疾病，它们总称为病媒。食物或水可以成为疾病载体，病媒也可能是载体。但一个病原引发的大规模流行性传染病通常是由食物和水引起的，因这些在人群中大量消耗（第 28 章和第 29 章）。

流行病

主要的流行病通常分为共源流行病与宿主间流行病。图 25.4 将二者进行了比较。表 25.2 概述了一些重要流行病的流行病学关键特征。

由于水或食物等共同污染源引发的大量病例出现称为共源性传染病。它通常是由于

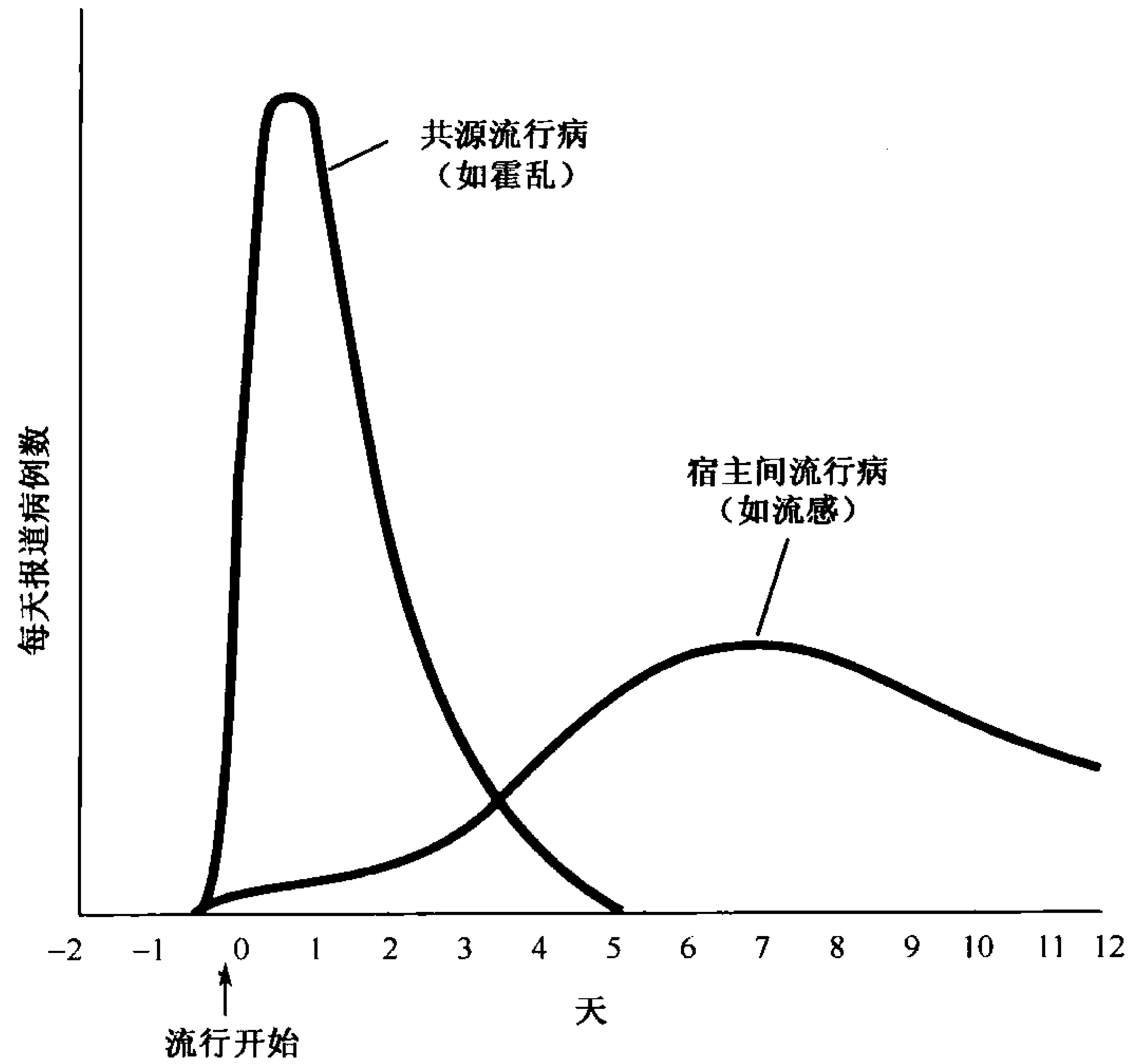


图 25.4　流行病的根源。流行病曲线有利于我们认识流行病的根源。共源性流行病，如来自污染食物和水的曲线中，其特点是有一个尖峰，然后迅速下降，但比上升时的曲线平缓些，将持续相当于一个潜伏期的时间。对于宿主间流行病，其曲线相对缓慢，进行性上升，并持续相当于几个潜伏期的时间。

中心配置系统的卫生功能失调而引起的。由食物或水引发的多为消化系统疾病，病原体存在于粪便中，当卫生条件较差时，污染的水和食物从消化道进入受体的肠道。公共健康措施较易控制这类传染病，其细节将在第 28 章和第 29 章中讨论。一个典型的共源性传染病是霍乱。1855 年，英国医学家 John Snow 最早提出霍乱是通过饮水传播的。他的研究表明，霍乱的传播与被粪便污染的水源有关。此案例中，被污染的水是共同传染源。具有感染力的病原体霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）是通过被污染的共源媒介传播。

共源性疾病发生的特征为迅速达到高峰期，这是由于大量个体在短期内同时发病（图 25.4），而且它的高峰期下降的也较快，但较上升为慢。在相当于该病潜伏期的一段时间内，不断会有病例发生。

在宿主间的流行病中，疾病的发生具有相对缓慢、进行性上升（图 25.4）和逐渐平缓下降的特征。在相当于多个潜伏期的时间段内，病例时有发生。该病例可能是由于易感人群中的感染个体对人群中的一个或一些个体的感染所致。病原体在易感个体内复制，到可传播期再感染下一个体，然后继续复制，重复这一感染过程。在第 26 章将讨论一些宿主间传播的传染病。

概念检查

病原体可以通过宿主间的直接接触传播，也可通过称为活载体的生物传播，也可通

过非生物（病媒）和常见的用品如水或食物传播。流行病可分为共源性和宿主间两种传播类型。

- ◆ 比较共源流行和宿主间流行，至少试各举一例。
- ◆ 提出解决共源流行和宿主间流行的方法。

25.5 宿主群落

被寄生物感染的、无免疫能力的宿主群落首先会出现大规模的感染，然后传染给未感染的宿主，形成流行病。当宿主群落产生抗性后，寄生物的传播就能得以控制，即在宿主和寄生物间达到了平衡。在极端情况下，若没有达到平衡，则会导致宿主的死亡，并最终使宿主群落灭绝。如果病原体没有其他宿主，那么宿主灭绝后，继而导致病原体的灭绝。因此，进化较好的病原体，能与宿主达到平衡，而不是摧毁宿主。宿主与寄生物相互影响着彼此的进化历程，也就是说协同进化。

宿主与寄生物间的协同进化

在澳大利亚，利用病毒控制野兔的数量，是宿主与寄生物间协同进化得很好的实例。

1859 年，野兔从欧洲引进澳洲，很快遍及大部分地区。1950 年，为了控制兔子的数量，黏液瘤病毒（Myxoma virus）被引进了澳洲。这种病毒通过蚊子等昆虫的叮咬，迅速在兔子中传播，强烈的毒力通常造成致死性感染。在几个月内，这种病毒遍布了大部分地区，在蚊子载体盛行的夏季，达到感染高峰，在冬季减少。但是，用从野兔体内分离到的病毒再次感染新生野兔和实验室兔子时，却发现分离到的病毒毒力有所降低。在病毒流行的第一年，超过 95%被感染的兔子死亡。然而，在随后的 6 年中，兔子的死亡率降低到 84%。在分离病毒的毒力下降的同时，野兔迅速对病毒产生抗性（图 25.5）。一段时间后，存活下来的野兔获得了抗性因子。到 20 世纪 80 年代，澳大利亚野兔的数量已接近引入黏液瘤病毒前的水平，对环境产生了巨大的破坏，并给本土动植物的生存带来压力。

1995 年，澳大利亚权威学者开始释放另一种毒力更大的兔出血病毒（rabbit hemorrhagic disease virus，RHDV）病原体，这是一种单链正 RNA 病毒（见 16.8 节）。由于 RHDV 是接触传播，并能在几天内杀死感染者。因此，专家相信这种传染病可以杀死所有兔子，避免产生抗性。他们认为病毒和宿主间，病原体是主导，这比节肢动物传播的黏液瘤病毒更可靠。起初的报道显示，RHDV 可以非常有效地减少兔子的数量。但是感染了本土出血热病毒的兔子，显示出对外来引入 RHDV 病毒的交叉抗性。这个没有预料到的抗性反应，限制了对澳大利亚特定地区野兔控制的效果。免疫兔群的建立显示，宿主形成了控制病原体的抵抗力，宿主-病原体间再次趋于平衡。

宿主和病原体的协同进化，可能是宿主间传播疾病共有的特点。然而，如前面提到的梭菌（*Clostridium* spp.，见 25.1 节）等一些不依赖宿主间传播的病原体，并不需要通过降低毒力与宿主共存。通常活载体传播的病原体是通过节肢动物或扁虱的叮咬而传播，而且不受人类宿主进化压力的影响。活载体只要在宿主死亡之前吸入血液，病原体

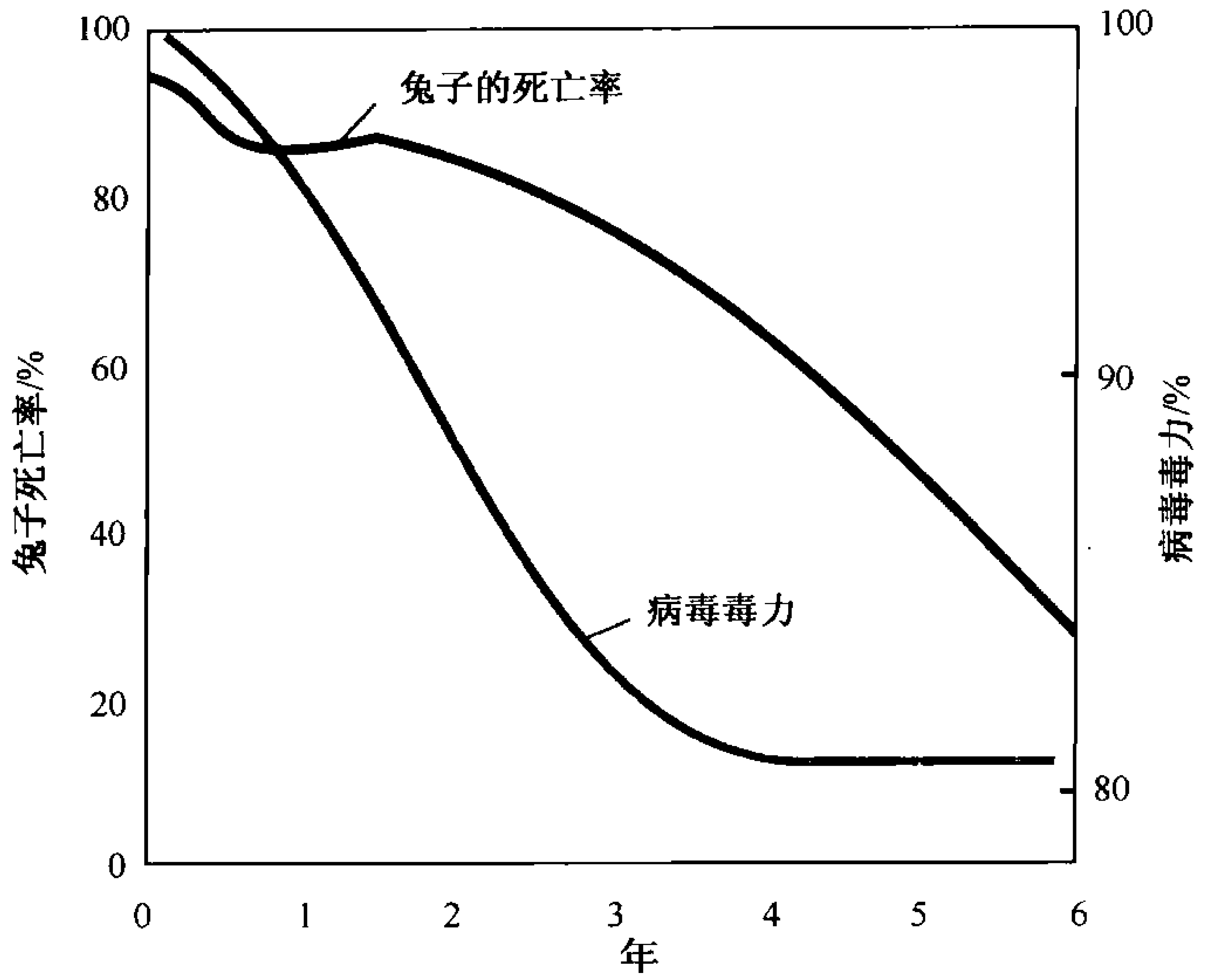


图 25.5　黏液瘤病毒毒力和澳大利亚兔子易感性的变化。数据来自 1950 年将病毒引入澳大利亚后。病毒的毒力用平均死亡率来表示，即每年从野外获得的病毒感染标准的实验室兔子所得的平均死亡率。兔子的易感性是通过适当高毒力的病毒感染同窝幼兔而测得的，这些病毒能杀死 90%～95%的正常实验室兔子。

就能维持很高的毒力，并通过感染杀死大批人类宿主。例如，疟疾寄生物疟原虫（*Plasmodium* spp.）在其包被蛋白上含有多种抗原决定簇，帮助其逃避宿主的免疫应答。这种避免宿主免疫应答的遗传能力提高了病原体的毒力，而与宿主的易感性无关。但是，对于疟疾宿主，则在高毒力病原体的进化压力下，对病原体产生特异抗性（见 27.5 节）。

另一个病原体毒力持续增加现象的证据是来自于对新生儿超致命腹泻病毒的研究。在医院环境中，大肠杆菌可引起若干腹泻疾病，甚至可以导致死亡，而来自医院患者体内的病毒其毒力似乎都有所增强。大肠杆菌在一个宿主体内复制，然后通过携带者，如护士和被褥设备等污染物传染给另一个患者。即使宿主死亡或不能与他人接触时，具有毒力的大肠杆菌仍可通过人与人间传播之外的途径感染他人。有时特殊的努力如用消毒剂彻底清洗病房和家具，以及医护人员的调离，是切断这些超毒力感染环所必需的。

群体免疫

群体免疫（herd immunity）是指具有高比例免疫个体的群体对感染的抵抗力。群体免疫状况的分析对认识免疫在流行病发展中的作用十分重要。如果免疫个体的比例较高，则整个群体就得以保护。如果高毒力或长期感染，就需要高比例的免疫个体，以防止流行病蔓延。反之，所需的比例就低。

从群体免疫中，可以估计出保护人群免遭感染所需的免疫人数的比例。例如，从美国脊髓灰质炎病毒发病率的流行病学研究看，如果 70%的人群处于免疫状态，脊髓灰质炎就可消失。由于免疫个体不能传播病原体，切断了感染环。因此，他们保护了剩余人群（图 25.6）。对于流感和麻疹这样的高感染疾病，需要较高比例的免疫人数，

90%～95%才可确保群体免疫。

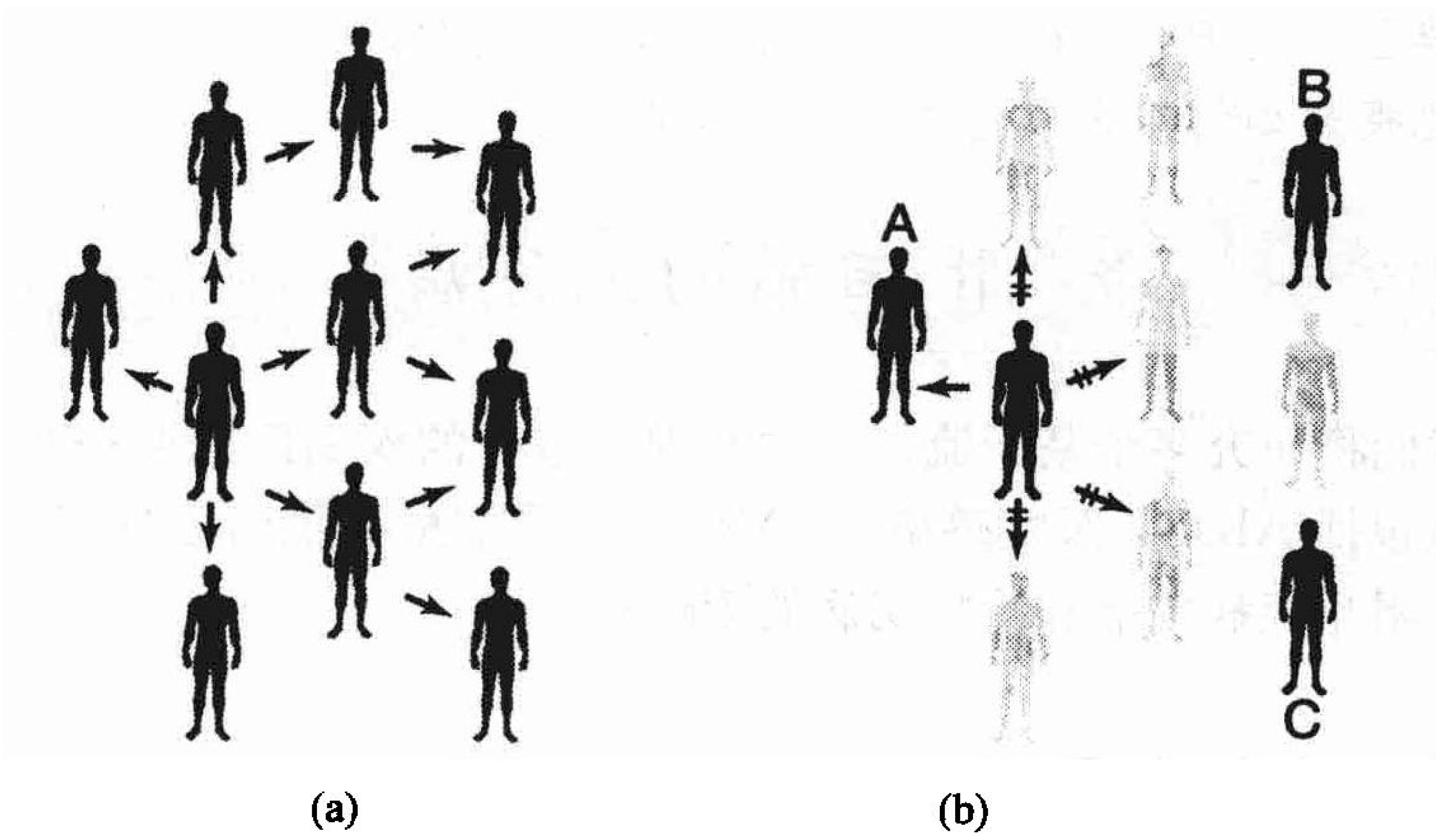


图 25.6　群体免疫和感染传播。一些个体的免疫保护了其他非免疫个体，使其免受感染。(a) 在一个非保护人群中，一个感染者（红色）可以成功地感染（箭头）所有易感个体（蓝色）。新感染的个体可以直接再感染其他易感者。(b) 传染力适中的病原体，如白喉棒状杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*；白喉），在适当密度的人群中，感染者（红色）不能将疾病传染给所有易感者，因个体具有抵抗力（黄色），即通过提前暴露在病原体下或者免疫而对白喉棒状杆菌产生抗性，这就切断了病原体传播链。甚至当易感个体 A（蓝色）感染了疾病，其他的易感个体 B 和 C 也可以被保护。对于具有适中传染能力的病原体，如白喉棒状杆菌，70%的免疫比例就能保护整个人群。对于高传染力的病原体，如水痘（水痘；见 26.7 节）需要高达 90%的免疫比例，才能阻止传播。

对白喉而言，免疫比例约为 70%。但对几个小规模白喉暴发的研究显示，在人口稠密区，要防止疾病传播需要更高的免疫比例。当易感人群频繁与受感染人群接触时，即使传染因子并不具有高感染性，人与人之间的传染依然会发生。在白喉的例子中，有个较为复杂的现象，即免疫个体像慢性携带者一样仍可传播病原体（不显著感染），这是因为免疫体系能保护宿主免受白喉毒素的影响，但是并不保护宿主免受白喉感染（见 26.3 节）。

疾病的周期

流行病和群体免疫的原理可用来解释疾病周期性发生的原因。在小学生中具有高发病率的流感就是一个很好的例子。流感病毒是通过空气传播的（见 26.8 节），因此它的感染多发生于学校等人口密集区。由于流感病毒的毒株实际上每年都在变异，因此大多数小孩都是易感者。一旦病毒传入学校，就会导致流行病的暴发和传播。实际上，每个个体都被感染了，但是随后就产生了免疫力，当免疫人群建立后，流行病就减退了。

概念检查

随着时间的推移，宿主和病原体进行着协同进化，从而达到利于双方共存的稳定状态。在群体免疫状态下，对某种疾病的高比例免疫使该疾病的流行受到了控制。当大量

的、复发性的非免疫群体（如入学儿童等），接触到病原体时，疾病的周期就开始了。

◆ 用一典型的例子解释宿主和病原体间的协同进化。

◆ 群体免疫是如何防止未免疫个体染病的？

Ⅱ 目前的流行病

在这章我们将研究多个基于流行病学原理而进行的疾病跟踪调查和收集到的数据。这些数据文献包括 AIDS、医院感染、SARS。这些信息提供给公共健康工作者，以便他们能够制定阻止疾病传播和治疗疾病的策略。

25.6 AIDS 大流行

获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome，AIDS）是一种攻击免疫系统的重要疾病（见 26.14 节）。1981 年在美国确诊了第一个病例，到 2003 年，美国报道 AIDS 病例 928 407 人，截止到 2002 年已有 531 669 人死亡。在美国每年有近 40 000 个新病例被确诊（图 25.7）。在世界范围内，从 1981 到 2003 年至少有 7000 万人被导致艾滋病的人免疫缺陷病毒（HIV）所感染；2500 万人已死于艾滋病；4000 万患病者目前仍存活。全球每年新增感染者 500 万，南非有 100 万感染者；非洲亚-撒哈拉沙漠（Sub-Saharan）有 2660 万感染者（表 25.3）。在非洲国家博茨瓦纳（Botswana）和斯威士兰（Swaziland），有 39%的成年人感染了艾滋病。2003 年，艾滋病造成约 300 万人死亡，其中在非洲亚-撒哈拉沙漠有 230 万人死亡。

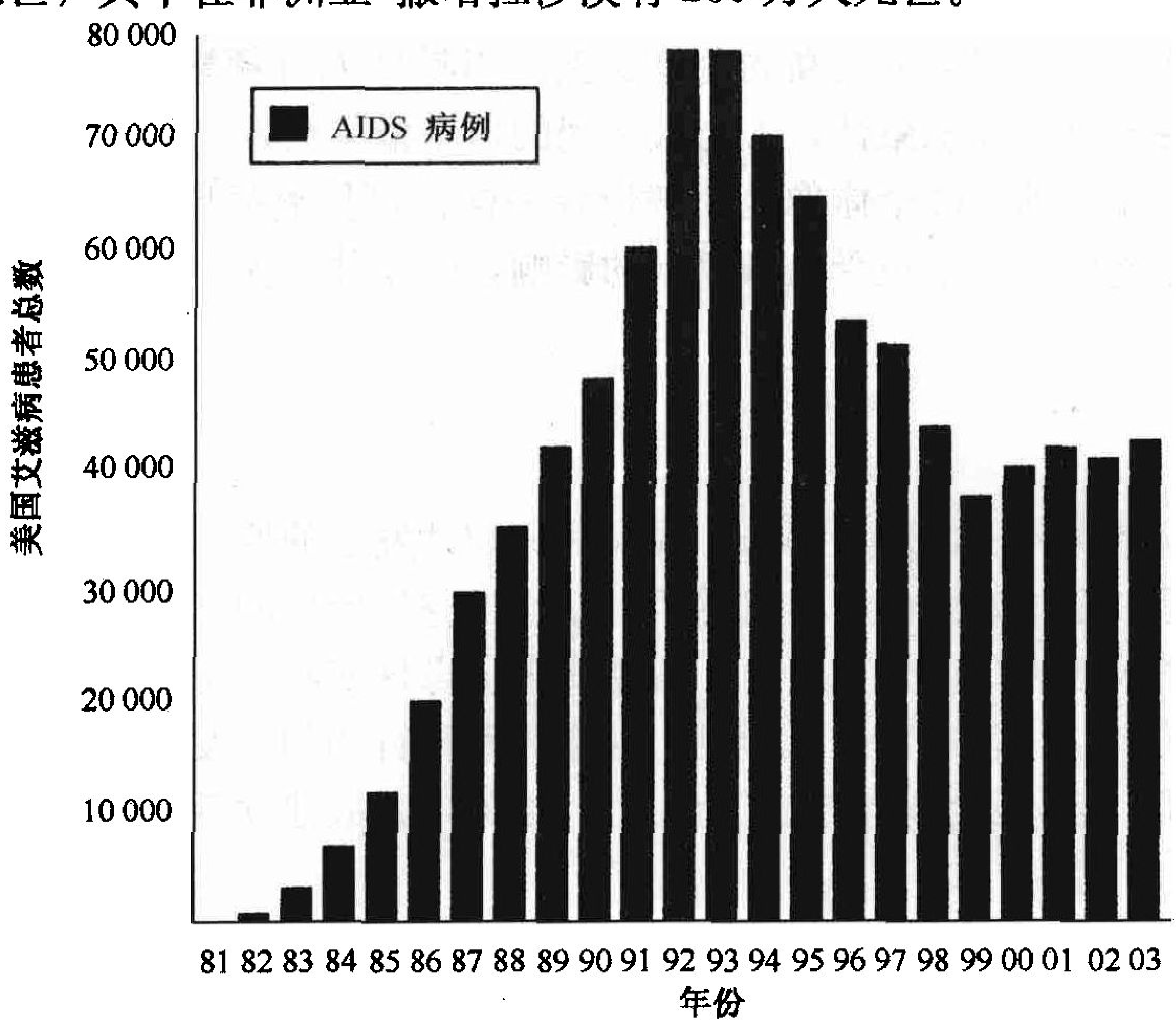


图 25.7 从 1981 年至 2003 年美国每年确诊的艾滋病病例。共有 928 407 人感染艾滋病，到 2003 年估计有 531 669 人死亡。数据来自疾病防控中心艾滋病防护部门。

表 25.3 2003 年全世界各地区艾滋病感染人数

地区	HIV/艾滋病感染者	地区	HIV/艾滋病感染者
北美	1 000 000	北非和中东	600 000
加勒比海	460 000	非洲撒哈拉	26 600 000
拉丁美洲	1 600 000	东亚和太平洋	1 000 000
西欧	600 000	亚洲南部和东南部	6 400 000
东欧和中亚	1 500 000	澳大利亚和新西兰	15 000

全球 HIV/AIDS 感染者约有 4000 万，该数据来自世界卫生组织和美国艾滋病联合计划。

流行病追踪

美国对 AIDS 病例的初期调查结果显示，在同性恋男性和静脉药物滥用人群中，艾滋病具有很高的发病率，这表明病原体可以通过性交和被污染的注射器传播。输血者或血液产品也有很高的危险性，在 1982 年前，需要输入血液制品的血友病患者和少数一些接受输血或组织移植的人感染了艾滋病（而今天只有不到 1%的艾滋病病例是通过这种方式感染的)。艾滋病与血液或组织间的关系增加了传染性的传播。

在发现艾滋病病毒后不久，实验技术获得发展，人们在血清中检测出艾滋病病毒的抗体（见 24.10 节和 24.11 节)。这使得我们可以在不同人群中进行艾滋病感染率的调查，并提供一种检测方法，避免通过输血出现新的艾滋病病例。图 25.8 中的模型显示了病原体是通过性交和血液传播的典型例子。特定人群具有明显的高发性，这表明艾滋病不会通过人与人之间的常规接触传播，如呼吸道或者被污染的食物和水。相反，体液、血液和精液被认为是艾滋病病毒传播的主要载体。

在美国，艾滋病在男性同性恋中发病率相当高（图 25.8)。但是在女性、特定民族、少数民族的调查数据表明，同性恋不是艾滋病的易感因素。例如，女性中的异性接触群体，患病危险性是最高的（图 25.8)。在非洲裔美国人和西班牙人中，静脉药物注射与同性性交行为几乎在同等程度上传播艾滋病病毒。从整个高危人群考虑，同性性交是导致成人艾滋病蔓延的主要因素。艾滋病高危人群患病因素的不同，促使我们去寻找所有因素的共同点。实际上易患艾滋病的人，都有两个共同的特殊行为。第一，他们沉溺于性或者药物的使用，这些活动涉及体液交换，通常是精液或者血液；第二，患艾滋病的人通常与复杂的多个伴侣发生体液交换，包括性交和共用药物注射器，这些行为增加了与艾滋病感染者发生体液交换的概率，从而增大了他们感染艾滋病病毒和患艾滋病的概率。

血友病患者和血液交换受血者感染艾滋病的概率几乎已被根除。这一方面归功于对血液供应品的严格检验；另一方面，血友病患者所需要的凝血因子能抵抗热处理，而热处理足以使艾滋病病毒失活；第三方面，归功于基因工程产品的使用（见 31.7 节)。在 2002 年，有 158 名新生儿感染了艾滋病。艾滋病病毒可以通过母亲传给胎儿，在母乳中也有艾滋病病毒。感染艾滋病的母亲所生婴儿的血液中，有从母亲那里获得的艾滋病抗体，但是要等一年或者更长时间，才能确定婴儿是否感染了艾滋病。因为有 70%的婴儿，由于在出生时就携带了母体艾滋病病毒的抗体，从而免受病毒感染。

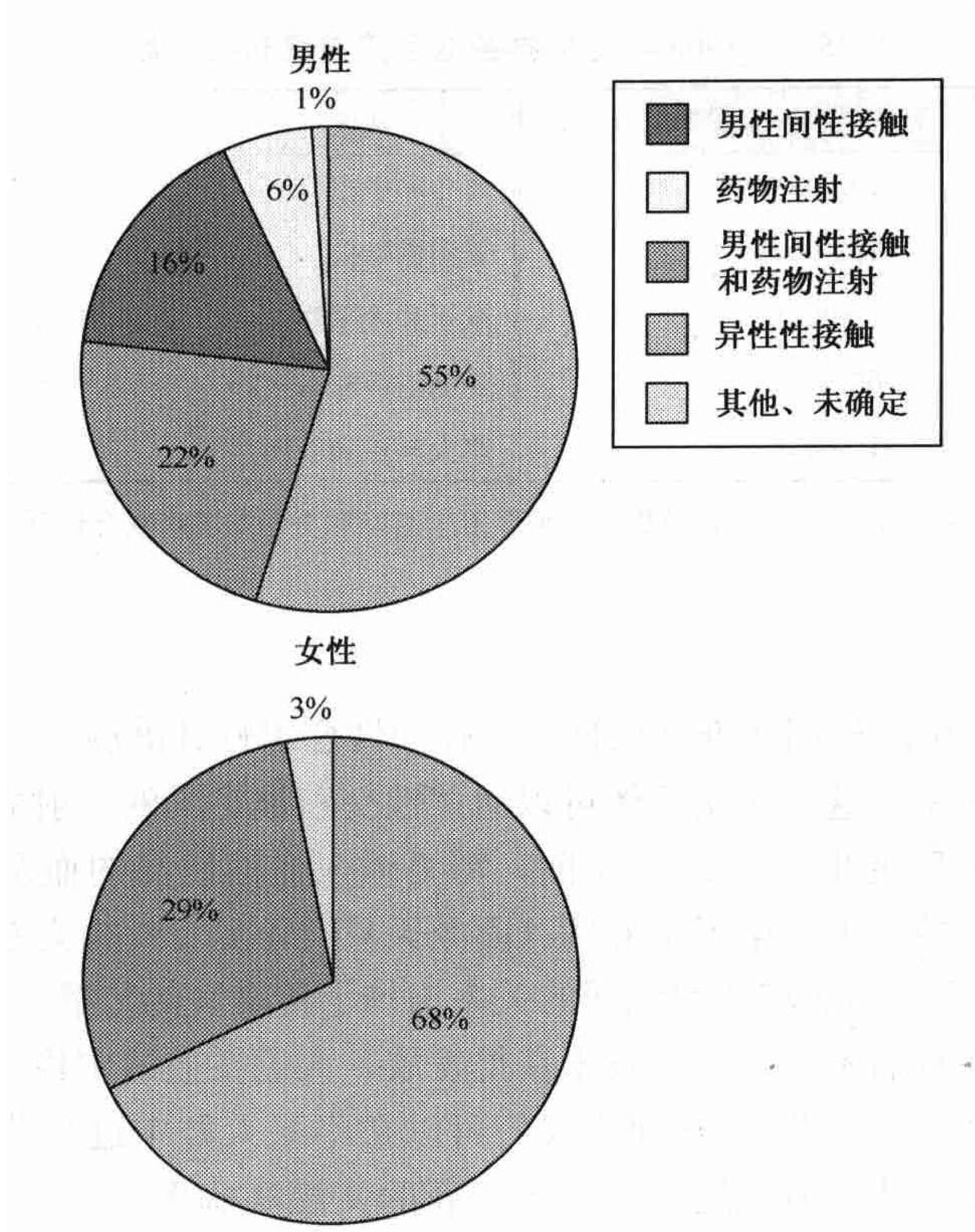


图 25.8 美国 2002 年在青少年和成年人中艾滋病的高危人群和性别的分布。总共报道病例数 42 745 例。男性艾滋病例数 $N=31\ 712$，女性艾滋病例数 $N=11\ 059$。数据来自疾病防控中心的艾滋病防护部门。IDU（使用注射药物）。

对非洲的流行病学调查发现，艾滋病的传播与特殊性行为如同性恋不相关，因为异性恋是传播艾滋病的主要途径。在一些地区，男性比女性更少感染艾滋病。性交易个体高危人群的确定，反而促进了健康教育活动的发展。该活动宣传了艾滋病的传播途径，并限制了高危人群行为。由于尚没有治疗艾滋病和有效地对艾滋病的免疫方法，所以公共健康教育已成为控制艾滋病的最有效的手段和阻止艾滋病传播的主要武器。我们将在 26.15 节讨论艾滋病的病理学和治疗。

概念检查

艾滋病是研究最彻底的一种流行病。艾滋病将继续成为公共健康的难题，特别是在发展中国家。虽然我们对艾滋病的病理学和传播了解得很清楚，但是目前仍没有对艾滋病有效的治疗和对其免疫的方法。

◆ 简述在你的国家感染艾滋病的主要危险因素。

◆ 估计美国现在感染艾滋病的总人数，并预测在未来两年会有多少人感染艾滋病。

25.7 医院获得性（医院）感染

医院通常是患者恢复健康的地方，但也可能使患者变得更虚弱。患者之间或者医护人员与患者之间的交叉感染一直是一种危险。医院的感染被称为医院感染（nosocomial infection，在拉丁文中 *nosocomium* 是医院的意思），在被调查的所有患者中约有 5%的人发生医院感染。在特定的医疗条件下，如特护区，多达 10%的患者获得医院感染。在美国，每年约有 200 万例医院感染者，导致 8 万人直接或者间接地死亡。

医院的感染有时是由患者引起，但更大程度上是由于医院环境中选择并保留下来的病原微生物造成的。例如，在医院环境下，具有多重耐药性的微生物，通常作为正常菌群在宿主间传播。在患者或医护人员身上发现的医院病原体通常是正常菌群。

医院环境

传染病可以轻易而迅速地在医院环境中传播，具有多方面的原因。①由于本身患病（高危性宿主），许多患者对传染病的抵抗力弱（见 21.13 节）。②医院治疗的传染患者，可能是高毒力病原体的栖居地。③房间和病房里拥挤着大量的患者，增加了交叉感染的概率。④医护人员在患者间的活动，增加了传播病原体的可能性。⑤许多医疗程序，如皮下注射、脊髓穿刺、组织取样（活组织切片检查）及取血等过程，破坏了皮肤屏障，增加了病原体感染患者的危险性。⑥在医院的产房，新生儿由于免疫系统发育不完全，而对特定的病原体具有易感性。⑦外科手术中，内部器官被暴露在污染源中，并且手术的压力还会降低人的抵抗力。⑧特殊的治疗药物，如用于消炎的类固醇药物增加了感染的可能。⑨控制感染的抗生素使用，筛选出了抗性菌株（见 20.12 节）。表 25.4 总结了医院获得性感染的相关信息。

表 25.4　美国特护机构的医院感染数量、位置和病原体的分布

	血液	肺炎	尿路
病原体	**数量**	**数量**	**数量**
肠杆菌属变种（*Enterobacter* spp.）	1083	4444	1560
大肠杆菌（*Escherichia coli*）	514	1725	5393
肺炎克氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae*）	735	2865	1891
流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）		1738	
铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）	841	6752	3 365
金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）	2758	7205	487
葡萄球菌属变种（*Staphylococcus* spp.）	8181		838
肠球菌属变种（*Enterococcus* spp.）	2967	682	4226
白色假丝酵母（*Candida albicans*）	1090	1862	4856
其他病原体	3774	12 537	8 075
总数[a]	21 943	39 810	30 701
总百分比/%	23.7	43.1	33.2

a. 最近 8 年医院特护区医院感染患者总数达 92 454 人。

来源：美国芝加哥亚特兰大疾病防控中心国家医院感染监督系统报道。

医院病原体

医院病原体集中在几个位置感染，主要为尿道、血液和呼吸道。少量的病原体就能引起这些位置相当程度的医院感染（表 25.4）。

一个最重要的医院病原体是金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*），它是引起肺炎的最常见病原体，并且也是引起血液感染的第三常见病原体。金黄色葡萄球菌的治疗问题很多。许多菌株通常具有毒力，并且对普通抗生素具有抗性（见 20.12 节），这使治疗变得很困难。除了金黄色葡萄球菌外，葡萄球菌属的其他种，现已成为医院获得性血液感染的罪魁祸首，同时也是造成伤口感染的主要因素。葡萄球菌属中的大多数成员，可成为患者和医护人员上呼吸道或皮肤上正常菌群的一部分。

大肠杆菌（*Escherichia coli*）是医院中引起尿路感染最常见的病菌，但是肠球菌（*Enterococcus species*）、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、白色假丝酵母（*Candida albicans*）和肺炎克氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae*）造成的感染也较常见。肠球菌、大肠杆菌和肺炎克氏杆菌常在人体中发现，而白色假丝酵母是机会致病菌很好的例子：它们常在环境中存在，仅感染抵抗力低下的人（见 21.13 节）。在医院感染者中，分离到的铜绿假单胞菌通常具有多重抗生素的抗性，治疗很复杂。大肠杆菌、葡萄球菌和肠球菌也具有潜在的多重抗药性（见 20.12 节）。

概念检查

许多常见的微生物都有可能成为医院环境病原体。医院里的患者通常对传染性疾病具有易感性，并且被暴露在多种感染病原体包括机会致病病原体的医院环境中。某些病原体对抗生素具有抗药性，使得对这些感染的治疗变得复杂。

◆ 为什么医院中的患者比普通人对病原体更敏感？

◆ 为什么病原体对抗生素的抗性是医院环境中的主要问题？

◆ 机会致病病原体的来源是什么？

25.8 严重急性呼吸系统综合征

严重急性呼吸系统综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS）是一种人畜共患的传染病，首次于 2002 年 11 月在中国广东发现。到 2003 年 2 月，该病毒已经扩散到 32 个国家。国际性旅游成为 SARS 病毒的传播途径。SARS 病毒是来源于动物的一种冠状病毒。有证据表明，中国人作为野味食用的野生动物果子狸可能是病毒的动物传染源，而且果子狸确实是携带该病毒的一种动物。

SARS 冠状病毒

严重急性呼吸系统综合征的冠状病毒（SARS-CoV）是引起 SARS 的病原体。冠状病毒是单链 RNA 病毒，通常引起较轻微的上呼吸道感染，在人类中就像是感冒，在动物中表现为呼吸道或肠道疾病（见 9.12 节）。SARS-CoV 极少引起导致肺炎的严重呼

吸系统疾病。如图 25.9 显示 SARS-CoV 是一个球形病毒，其直径为 120～160nm，在病毒粒子外排列有特异性的冠状蛋白。小图中显示了单个病毒的典型显微结构，大图显示了病毒在宿主细胞质中的定位和复制。



图 25.9　严重急性呼吸系统综合征的冠状病毒（SARS-CoV）。左上角显示的是分离到的 SARS-CoV。单个病毒粒子的直径约 125nm。大图显示了结合在细胞质膜囊泡上及粗面内质网中的冠状病毒。病毒在细胞质中复制，并通过胞质膜囊泡运输到细胞外。

病毒分离后的两个月，SARS-CoV 的基因组序列被破译。结果表明 SARS-CoV 不是已有冠状病毒的突变体，也不是人和动物冠状病毒的重组体。因为 SARS-CoV 与已知单链病毒几乎无同源性，也不可能是基因工程的产物或生物恐怖者的试验物。SARS-CoV 很可能是很久以前就存在于动物宿主中，并不断进化，相当偶然地获得了感染人的能力。

SARS 流行病学

在人类中，SARS-CoV 通过分泌物、排泄物、人与人接触或者粪便污染传播。与感冒病毒非常相似的是 SARS-CoV 很耐寒、易传播，并且很难被清除。

通常一个新的感冒病毒并不能引起很大关注，但是 SARS-CoV 引起的感染可造成大规模的发病和死亡。已有约 8459 人感染了 SARS-CoV，其中 800 多人死亡，整体死亡率接近 10%。约 20%的感染者是医护人员，这表明病毒具有很强的传染力。医护人员使用的标准控制传染的方法并没能阻止病毒的传播。作为人的病原体，就其毒力而言，对 65 岁以上的人群，病毒引起的死亡率接近 50%。由于具有高死亡率和易传播的特点，要控制 SARS-CoV 很困难。感染了 SARS 的患者，被隔离在负压的房间里。为了避免传染，医护人员与患者或与被 SARS-CoV 污染的物品接触时，须戴呼吸器。

人们应用已经建立起来的标准方法对 SARS-CoV 进行诊断：检测抗体，随时间延长抗体滴度上升（见 24.7 节）；从临床标本的细胞培养物中分离和鉴定病毒（见 24.13 节）；或者阳性 RT-PCR 检验（见 24.12 节）。

SARS 来自于单一传染源，是迅速暴发出现的一系列传染病中的一个例子。国际人口流动加速了它的传播。另一方面，人们对病原体的迅速鉴定、全球关注、诊断方法的迅速形成，以及对新病原体生物学和基因组学探讨的相关努力，都为疾病的迅速控制带来了希望。

概念检查

感染了一种新型的人畜共患病毒 SARS-CoV 后，可引起严重急性呼吸系统综合征 (SARS)。通过呼吸途径在人与人之间传播。对这一高死亡率的病毒的控制是通过迅速诊断和隔离患者来实现的。

◆ 鉴定疑似 SARS-CoV 患者。

◆ 详细阐明消除 SARS-CoV 传播的方法。

Ⅲ 流行病学和公共健康

在这一部分中，我们将推荐一些鉴定、根除人群中传染病的方法。同时介绍一些现在和将来会发生的传染病对社会公共健康的威胁。

25.9 控制疾病的公共健康措施

公共健康是指大多数人的健康状况，以及公共健康机构为控制疾病的发生所采取的行动。在过去的 100 年中，特别是在发达国家，许多传染病的发生率都急剧下降，这在很大程度上要归功于基础生活水平的普遍提高。营养水平的提高、饮水的净化、先进的公共废水处理技术、宽敞的居住条件、较低的工作负担等都在很大程度上对疾病的控制做出了贡献，特别是降低了疾病相关的危险因素（见 21.13 节）。但是，对于个别疾病如天花、伤寒、白喉、布鲁氏菌病和小儿麻痹症等都需要采取积极的有针对性的公共健康措施如使用疫苗等。

直接控制栖居地

如果病原体主要来自家畜，那么消除被感染动物的疾病，就可以阻止其感染人类。免疫手段或者杀死被感染动物，可使疾病在动物中消灭，从而避免人类感染。利用这些方法几乎根除了人类的布鲁氏菌病和牛结核病。近年来这些方法在英国、加拿大、美国被用来消灭牛海绵样脑病（疯牛病）。此外，家畜的整体健康水平也有所提高，这对牧场主和消费者都具有长期的经济意义。

当栖居地是野生动物时，根除疾病要困难得多。狂犬病在野生和家养动物中都有发生，但是，主要是由野生动物传染给家养动物的。因此，在人群和家养动物中控制狂犬

病可以通过免疫的方法来实现。但是，至少在美国，大多数狂犬病例是野生动物（见 27.1 节）。因此，根除狂犬病就需要免疫或者破坏所有野生动物的栖居地，包括不同种类的浣熊、蝙蝠、臭鼬和狐狸。在有限的动物种群中，通过口服免疫疫苗，来控制狂犬病是可行的；但在美国这一实验尚未在大种群、多种动物中尝试。

如果栖居地是昆虫（如引起疟疾和西尼罗河热的蚊子；见 27.5 节和 27.6 节），就可以用化学杀虫剂或者其他致死试剂有效根除栖居地，从而达到疾病控制。但是，在使用有毒和致癌化学药品时，要考虑到环境的平衡。在一些情况下，一种公共健康问题解决了，又会引发另一种问题。例如，二氯二苯三氯乙烷（DDT）（见 19.18 节）是很有效的杀虫剂，消灭了北美的黄热病和疟疾。但是，由于考虑到环境问题，现在美国已经禁止使用了，然而在许多发展中国家，仍在使用 DDT 来控制蚊子传播的疾病。但从全世界范围看，DDT 的使用正在逐渐减少。

当人类成为栖居地时（如艾滋病），控制和根除疾病就变得相当困难，特别是对那些无症状的携带者。另一方面，对于有些疾病，如果每个患者和所有可能接触者都受到严格的检疫、免疫和治疗，那么根除也是可能的。不过对于人类来说，这仅限于那些无潜伏期，并能够通过免疫或化疗防止的疾病。这个策略已经被世界卫生组织成功地用于根除天花，并且现在又被用来消灭脊髓灰质炎（见下文）。

直接控制病原体传播

经食物和水传播的病原体，可以通过消灭载体中的病原体，控制共源载体的污染，以达到消除疾病的目的。水质净化（见 28.3 节）很大程度上降低了伤寒的发病率，对牛奶的巴斯德灭菌预防了人感染牛结核病。食品保护法的实施大大减少了许多人类肠道病原体的传播（第 29 章）。

呼吸系统病原体的传播更难预防。对空气的化学除污尝试已告失败。空气过滤是一个可行的方法，但是仅限于小的密闭环境（见 20.3 节）。在日本，许多上呼吸道感染的患者会戴口罩，以防止将疾病传染给他人，这种方法虽然可行，但属于自觉行为，很难成为公共健康措施。

免疫接种

人类利用免疫接种已成功地控制了天花、白喉、破伤风、百日咳（whooping cough）、麻疹、腮腺炎、风疹及脊髓灰质炎，对于其他一些感染性疾病也得到了有效的疫苗（见 22.13 节）。正如我们在 25.5 节中讨论到的，控制疾病传播，并不需要对人群进行 100%免疫。疾病的有效控制是和免疫百分率、病原体的感染性和毒力，以及人们生活条件相关的（如拥挤）。

麻疹就是一个群体免疫的成功例子。高传染性麻疹病毒的偶然出现，使得我们认识到对已有病原体保持适当免疫水平是十分重要的。在 1963 年，有效的麻疹疫苗获得许可之前，美国每年有超过 40 万麻疹病例，几乎每个美国儿童都会自然感染麻疹。疫苗推出后，每年的感染者数量急剧下降（见 26.7 节），1983 年降低到 1497 例。但是，到 1990 年，儿童的麻疹免疫率降低到 70%，新增病例达到 27 786 例。在随后的三年中，通过共同努力，麻疹免疫率又提高到 90%以上，抑制了麻疹在美国的传播。在 1993

年，仅报道了 312 个病例。现在美国每年报道病例约 100 个，其中一半以上是被来自其他国家的游客传染所引起。

现在美国实际上所有的儿童都已获得免疫，但是多达 80%的成年人却缺乏对重要传染病的免疫力，这是由于童年时代获得的免疫力会随着时间延长而下降。当儿童传染病发生在成人身上时，将会产生严重的后果。例如，母亲在妊娠期感染了风疹（一种病毒性疾病；见 26.7 节），胎儿的发育就会受到严重的影响。麻疹、腮腺炎和水痘对成人的影响比对儿童严重得多。

所有成年人都被建议，要复查一下他们的免疫状况和检查他们的病历（如果必须的话），以确定接受免疫的日期。例如，破伤风的疫苗应该至少每十年注射一次。在调查的成年人中，40 岁以下的人群有大于 10%的、60 岁以上的人群有大于 50%的人没有得到免疫保护。成年人也应该去复查麻疹疫苗的免疫状况。1957 年以前出生的人，可能在儿童时期患过麻疹而具有免疫。1956 年以后出生的人，也许受到了免疫。但是，早期疫苗的效果不一，特别是那些 1 岁前接受注射的人们可能没有建立起足够强的免疫。成年人不需考虑再次注射脊髓灰质炎疫苗，除非他们要到仍流行该病的西非和亚洲旅行。

隔离

隔离（quarantine）是指限制具有传染性个体的行动，以防传染给人群中的其他成员。隔离持续的时间是特定疾病的最长传染期。隔离措施必须防止感染个体与未暴露个体的接触。隔离不像医院环境下对特殊传染病所采取的隔离那样严格。

国际上认同 6 种疾病需要隔离：天花、霍乱、鼠疫、黄热病、伤寒和回归热。它们中的每一种都被认为是十分严重的疾病，尤其容易传染。此外，其他高度传染疾病，如埃博拉出血热和脑膜炎也可以在大规模暴发时采取隔离措施（见 15.10 节和表 25.5）。

表 25.5 美国报道的传染性病原体和疾病

细菌引起的疾病	真菌引起的疾病
炭疽	球孢菌病
肉毒中毒	似隐孢菌病
布鲁氏菌病	**病毒引起的疾病**
软下疳	获得性免疫缺陷综合征（AIDS）和儿童 HIV 感染
沙眼衣原体	脑炎/脑膜炎（蚊子传播）
霍乱	加州东部马脑炎
白喉	圣路易斯西部马脑炎
埃利希氏菌病	西尼罗河脑炎
肠出血性大肠杆菌	汉坦病毒肺病综合征
大肠杆菌 O157：H7	肝炎 A、B、C
淋病	HIV 感染
嗜血流感菌	成人
入侵性疾病	儿童（<13 岁）
麻疹病	麻疹
溶血性尿毒症	腮腺炎
军团菌症	小儿麻痹症，瘫痪

续表

细菌引起的疾病	病毒引起的疾病
李斯特氏菌病	狂犬病，动物，人
莱姆氏病	风疹，急性和先天综合征
脑膜炎球菌病	严重急性呼吸道综合征（SARS）
百日咳	天花
鼠疫	水痘
鹦鹉热	黄热病
落基山斑疹热	**原生动物引起的疾病**
沙门氏菌病	环孢霉素病
痢疾	疟疾
链球菌病 A	贾弟虫病
链球菌毒性中风综合征	**蠕虫引起的疾病**
梅毒	滴虫
破伤风	
毒性中风综合征	
结核	
野兔病	
伤寒	
万古霉素过渡金黄色葡萄球菌（VISA）	
万古霉素抗性金黄色葡萄球菌（VRSA）	

监控

监控（surveillance）指当疾病发生时对其进行观察、确认和报道。表 25.5 列出了美国正在监控的疾病。在表 25.2 和表 25.8 中列出的几种传染病并不在监控名单内。但是，许多其他疾病是由确认指示病例地区的实验室负责调查的。所谓指示病例，显示的是新流行的具有新症状、新特征，或高发性的病原体。

美国疾病预防控制中心（Centers for Disease Control and Prevention，CDC）属于国家传染病中心（National Center for Infectious Disease，NCID），行使一系列监控程序，如表 25.6 所示。在许多情况下，疾病会在一个以上的监控网络中报道，起初这些过多报道似乎不必要，但当许多疾病被分门别类后，就会影响到健康管理计划和政策了。作为一种被关注的疾病（表 25.5），国立医院感染监控系统（NNS）和 CDC 互相参照并报道了如万古霉素抗性的葡萄球菌传染的数据，为医院传染控制小组提供了国立数据库。利用这些信息，健康管理提供者能够制定和执行合理的计划，用以隔离、诊断和葡萄球菌感染者药物敏感性的检测，从而确定抗性菌株，开始合理的治疗。

表 25.6　美国国家传染病中心（NCID）监控系统 2004 年对传染病的关注和追踪[a]

监督系统（缩略词）	疾病监督机构职责
121 城市死亡率报告系统	流感，肺炎，全部死亡
活性细菌活性监控	传染性细菌疾病
培根研究	与输血有关的细菌污染
边境传染病监督工程（BIDS）	美国-墨西哥边界的传染病
透析调查网（DSN）	血液透析患者的血管感染和细菌抗性

续表

监督系统（缩略词）	疾病监督机构职责
电子食物传播疾病调查和报告体系（EFORS）	食物引起的暴发
EMERGEncy ID NET	急性传染病
食物传播疾病动态监督网（FOODNET）	食物引起的疾病
全球突发传染病监控网（GeoSentinel）	全球突发疾病
淋球菌隔离监控工程（GISP）	淋病奈瑟球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）的抗生素抗性
一体化疾病的监控和报告所（IDSR）	世界卫生组织对非洲传染病的公开行动
特别看护抗微生物抗性流行病（ICARE）	健康护理中对抗生素的使用及抗生素抗性
国际突发抗生素抗药性研究与预防网（INSPEAR）	全球出现的抗药微生物
麻疹试验室网	美国和加勒比出现的麻疹
国家抗生素抗性监督体系：肠道细菌（NARMS）	从农作物和食品中分离到的人非伤寒沙门氏菌、大肠杆菌 O157：H7 和弯曲菌属（*Camylobacter*）的抗生素抗性
国家疟疾监督所	美国的疟疾
食物传播疾病监督的国家分子亚型网络（PulseNet）	食品传播细菌的分子指纹识别
国家医院感染监督体系（NNIS）	医院获得性感染
国家须申报疾病监督体系（NNDSS）	应报告的疾病（表 25.5）
国家呼吸道和肠道病毒监督体系（NREVSS）	呼吸道合胞病毒（RSV）、人副流感病毒、呼吸和肠道腺病毒、轮状病毒
国家医务工作者监控体系（NaSH）	医护人员职业性感染
国家结核基因型监控网	肺结核基因型菌群
国家西尼罗河热病毒监督体系	西尼罗河热病毒
国家健康实验室信息系统（PHLIS）	应报告的疾病
对于健康护理有关的突发性抗生素抗性的监督（SEARCH）	健康护理中突发的抗生素抗性
不明死亡和重要疾病监督体系	全世界突发传染病
美国流感监控医师监督网	260 个医疗站报道的流感发生率和流行情况
肝炎监督工程（VHSP）	肝炎
水传播疾病暴发监督体系	水传播疾病

a. 这些监督体系的联系信息刊登在：http://www.cdc.gov/ncidod/osr/site/surv_resources/surv_sys.htm.

病原体的根除

在特殊情况下，人类可以彻底根除某些疾病，如原发性天花已被成功消灭。正如我们在本节开始所讨论的，天花这种疾病的唯一栖居地是由急性天花感染个体构成的，只能依靠人与人的途径传染。感染的个体直接将疾病传染给以前没有接触过天花的人。天花是病毒性疾病，虽然不能被治愈，但免疫是很有效的方法，接种含有同源毒株的疫苗，实际就能达到完全免疫。1967 年，世界卫生组织（World Health Organization，WHO）制定了消灭天花计划。由于疫苗在世界范围内成功推广，使得天花的流行区域缩小至非洲、中东和印度的部分地区。在对传染区内所有人接种疫苗的初步工作完成后，每一个可能暴发天花的地区都被世界卫生组织的小组所关注，他们深入到发病区，将携带活性病毒的人隔离，并给所有接触者免疫；为了切断传染链，他们又对所有间接接触者进行了免疫。这种集中性的政策，在 10 年中，基本消灭了活性原发疾病，世界

卫生组织在 1980 年宣布人类已消灭了天花。

脊髓灰质炎是另一种病毒性疾病，人类在使用了有效的免疫方法后，也准备将其消灭（传染性脊髓灰质炎在西半球已经被消灭）。人类在对付脊髓灰质炎时，使用了与根除天花相似的策略，在 20 世纪 90 年代，世界卫生组织直接对剩余流行区进行大规模免疫。到 2004 年，已知的传染性脊髓灰质炎仅存于尼日利亚（在 2003 年传染到了相邻的西非国家）、印度和巴基斯坦。现在零星的暴发还出现在阿富汗，2003 年在埃及出现了一个病例。

麻风病也是一种仅感染人类的疾病，目前正在被逐步消灭。现在可以用复合药物对麻风病患者进行有效的治疗，用这些药物治疗患者的同时，也阻断了病原体麻风杆菌的传播（见 26.5 节）。

其他一些人类准备消灭的疾病是查格斯病（治疗感染者同时，消灭美国热带雨林中携带锥形虫的昆虫载体）和麦地那龙线虫病（饮水净化，以阻断麦地那龙线虫病的传播；几内亚蠕虫分布在非洲、阿拉伯、巴基斯坦和其他一些亚洲国家中），需要消灭的疾病还有梅毒（见 26.12 节）和狂犬病（见 27.1 节）。

概念检查

食物和水的卫生、载体的控制、免疫、隔离、疾病监控和病原体的根除是减少疾病发生的公共健康措施。

◆ 由昆虫栖居地和人携带引起的传染病在公共措施上控制的比较。

◆ 阐明终止传染病传播的公共健康措施。

25.10 全球健康思考

世界卫生组织将世界分成六个地理区域，用以收集和报道全球健康状况，如报道发病率和死亡率。这些地理区域是非洲、美洲（北美、加勒比海、中美洲、南美）、地中海中部、欧洲、亚洲东南部和西太平洋。在这里我们对比发达地区美国和发展中地区非洲的死亡率数据。

美洲与非洲传染病的比较

美洲约有 853 000 000 人，每年约有 600 万人死亡，也就是说每年每 1000 个居民就有 7 个死亡。在非洲有大约 672 000 000 人口，每年有 10 700 000 人死亡，也就是说每年每 1000 个居民中有 15.9 个人死亡。这些统计数据仅引起了人们对这些地区的关注，但是对这些地区死亡率起因的研究还很不清楚。如图 25.10 显示，在非洲，大多数人死于传染病；而在美洲引起死亡的主要因素是癌症和心血管疾病。非洲传染病的死亡率是美国的 10 倍。对发达国家 20 世纪（图 1.7）情况的调查结果显示，传染病死亡率的差异，是由公共健康服务设施不同造成的。发展中国家的区域资源缺乏，限制了健康管理、药品、食品和水的安全，以及免疫的发展。

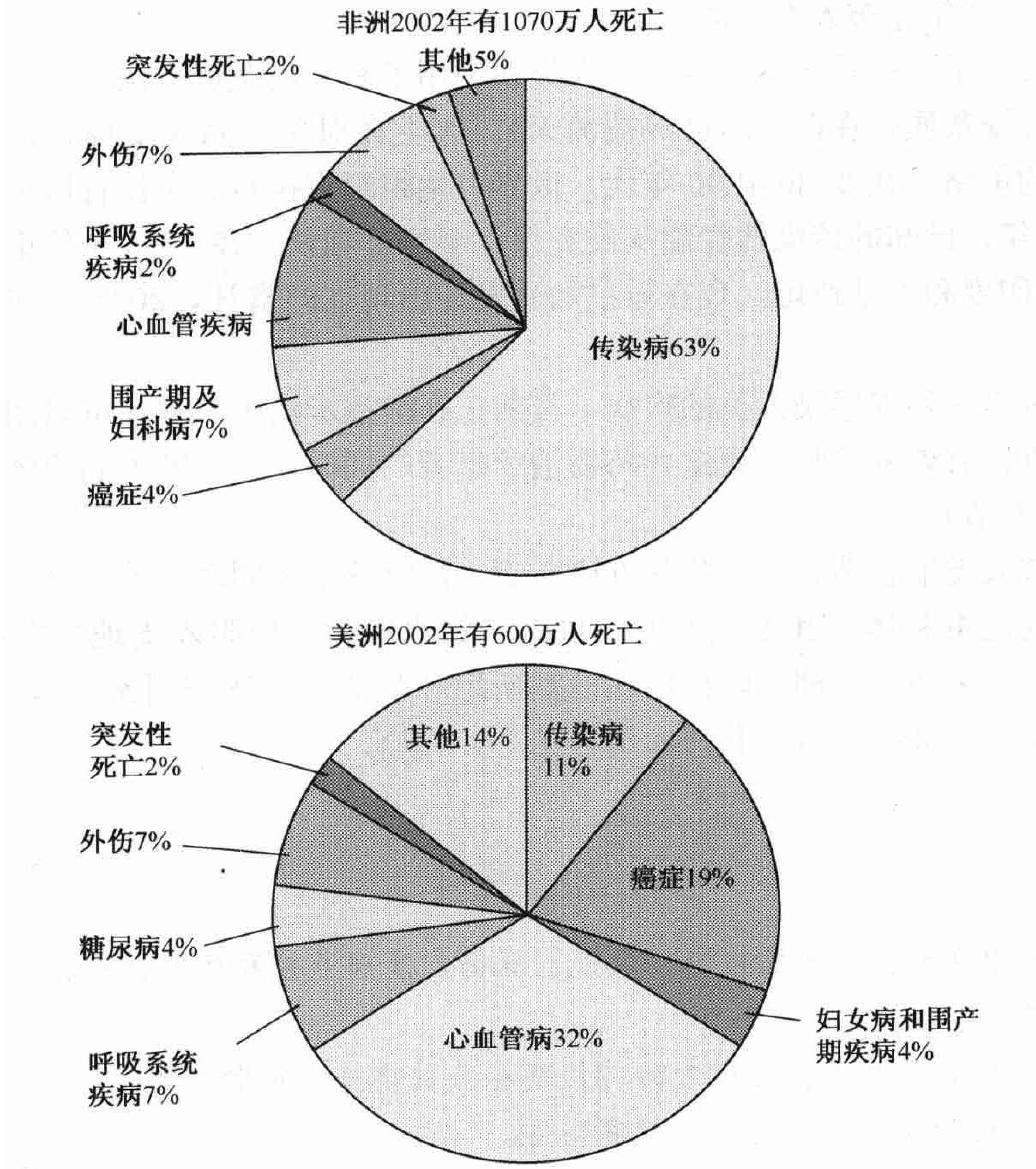


图 25.10 2002 年在美洲和非洲各致死因素所占的百分比。在非洲 1070 万例死亡中有 670 万人死于传染病。在美洲 600 万死亡者中有 62.3 万人死于传染病。人为死亡包括凶杀、自杀和战争。

到地方流行病地区旅游

世界上有许多地区疾病是高发的，去该地区旅行的人们应考虑到这一因素。旅游者可以通过免疫抵抗国外的地方流行病。表 25.7 中列出了对去国外旅行者关于免疫方面

表 25.7 为国际旅行者规定或推荐的免疫项目[a]

疾病	目的地	建议[b]
黄热病	热带或亚热带国家，特别是非洲中撒哈拉及南美洲	注射疫苗
狂犬病	乡下，山区及高山地区	如果直接与肉食野生动物接触要注射疫苗
伤寒	非洲、亚洲大部分地区，中部地区及南美国家	注射疫苗

a. 国家旅客健康传染病中心，美国健康与人类服务署，http://www.cdc.gov/travel。

b. 国际旅行者注射的疫苗有：白喉、百日咳、肺炎（甲乙型）、破伤风、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎、风疹和流感。大多数美国公民通过正常的免疫渠道已经获得免疫。从网站上可以查到各国家要求的特殊疫苗，同时还给出了一些特殊传染病的预防措施，如当游客到疾病流行区时需接受预防性治疗避免感染疟疾或鼠疫。目前进入美国不需要进行免疫。

的建议。许多国家现在要求出示黄热病的免疫证明，但只对高危人群推荐很多其他的非标准免疫。在世界的许多地方，旅游者可能会暴露在不具有效免疫的疾病环境中（如 AIDS、埃博拉出血热、登革热、阿米巴病、脑炎、疟疾和伤寒）。旅游者应事先采取有效的手段，如防止不加保护的性行为、避免昆虫和动物叮咬、饮用处理过的水、选择合适的储藏食物。当暴露在可疑环境中时，要使用抗生素和化疗预防药物。

概念检查

全球死亡人数中有 30%死于传染病。大多数传染病发生在发展中国家。到地方流行病高发区的旅游者，如果可能，要提前进行免疫并注意防止传染。

- 对比美洲和非洲传染病的死亡率。
- 列出你尚未免疫和明年可能接触到的传染病。

25.11 新出现和复发的传染病

作为全球性的健康问题，传染病的范围和重点在不断地变化。在这一节中，我们将讨论最近暴发的一些传染病和它们发生规律的变化与产生这一变化的原因，以及流行病学家用来确定和处理这些对公共健康造成新危险的方法。

全球范围内疾病分布的变化是剧烈而迅速的。病原体的变化、环境及宿主群自身都可能导致这些新的疾病迅速变化。而这些变化的疾病，在感染个体间具有高致病率和死亡率。我们把那些突然间流行起来的疾病称为新出现疾病（emerging disease）。新出现的传染不仅指"新"的疾病，而且还包括复发疾病（reemergence disease），这些一度得以控制又再次流行的疾病，它们多半是由于抗生素抵抗和公共健康系统的失控所引起的。近期全球范围内的突发性和复发性疾病列于图 25.11。表 25.8 中列出了具有潜在可能新出现和复发的疾病。此外，在表 25.2 中，列出的流行病具有新出现或复发成为广泛流行和大流行的潜在可能。

新出现疾病的流行并不奇怪，历史上类似新出现疾病包括梅毒（由苍白密螺旋体引起；见 26.12 节）和鼠疫［由鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）引起；见 27.7 节］。在中世纪，超过 1/3 的人口因欧、亚、非鼠疫的席卷而死亡。在 1918～1919 年，流感（见 25.1. 节和见 26.8 节）成为威胁公众健康的主要因素。在 20 世纪 80 年代，军团杆菌病［由侵肺军团菌（*Legionella pneumophia*）引起；见 28.7 节］、获得性免疫缺陷综合征（AIDS，见 26.14 节）和 Lyme 氏疏螺旋体症（见 27.4 节），成为主要的新传染病。近几年，在美国出现的病原体是西尼罗河热病毒（见 27.6 节）。世界范围内迅速出现的严重急性呼吸系统综合征（SARS），由于具有易传播和高毒力的特点，很可能会成为全球流行病（见 25.8 节）。

新出现疾病的因素

引起新病原体突发的原因有：①人口统计和人们的行为；②技术和工业；③经济发展和土地利用；④国际旅游和商贸；⑤微生物适应性及变化；⑥公共健康措施的失控；

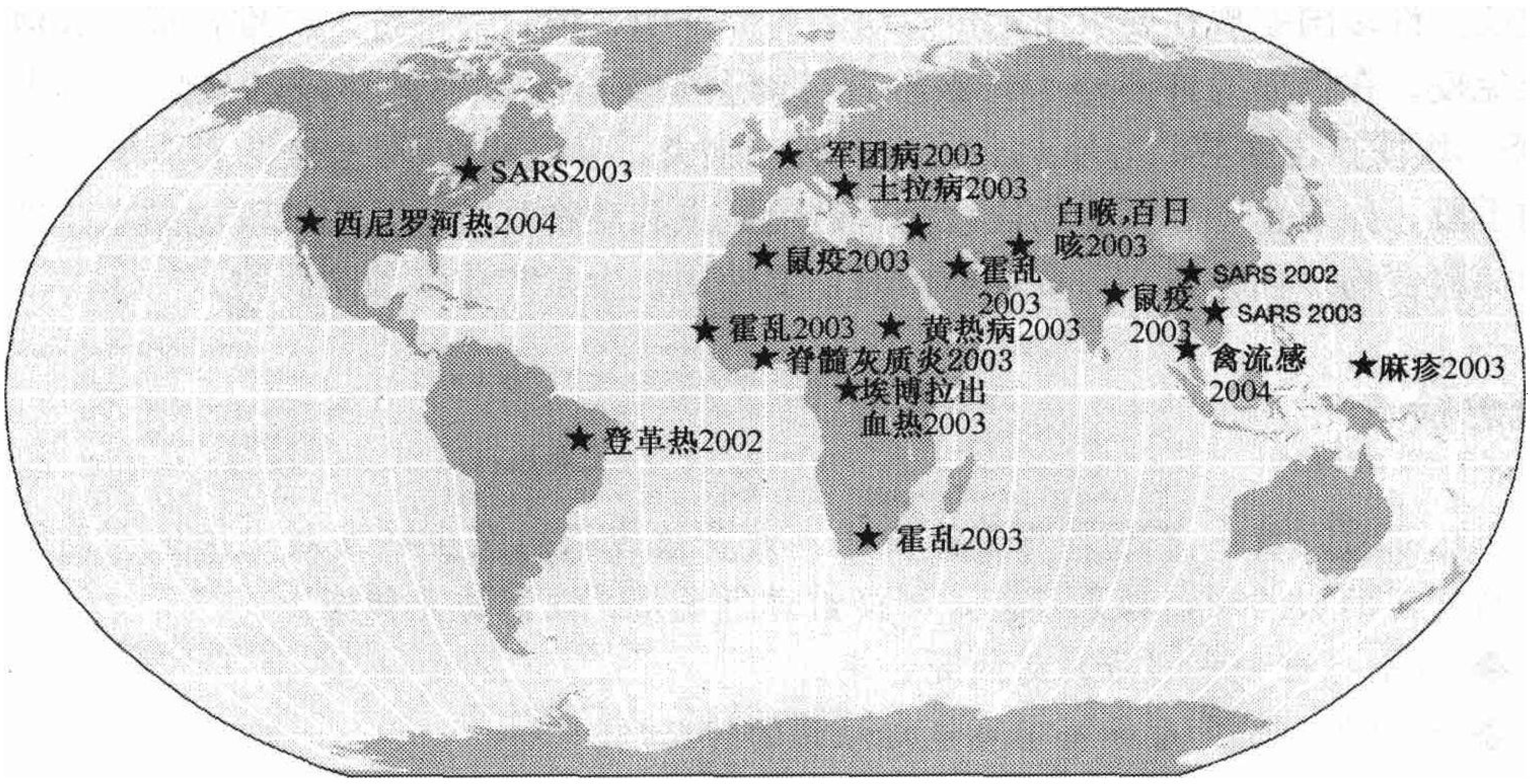


图 25.11 全球范围内新出现和复发的疾病近期暴发的情况。新出现和复发的疾病最初都是以地方传染病的形式被发现。这里没有记录地方暴发的常见疾病。这里列出的所有疾病都能导致地方甚至世界流行。图中没有给出已确定的世界流行病，如 HIV/AIDS 的分布状况；以及每年可预料的流行病，如人流感的分布状况。

⑦异常的自然事件导致常规的宿主-病原体间的平衡破坏。

在近两个世纪中，人口统计发生了很大的变化。在 1800 年，只有不到世界人口 2%的人生活在城市，而今天，世界上近乎一半的人口在城市生活。现代化城市中心的数量、规模及人口密度均为疾病的传播提供了方便。例如，由蚊子（*Aedes aegypti*）传播的登革热病毒，所引起的登革热病（表 25.8）是热带地区最严重的出血性疾病。目前，该病仍是热带地区的流行病；而在 1950 年前，由于人口少，而且分布广泛，病毒难以传播，因此登革热是很少见的。

表 25.8 新出现和复发的流行病

病菌	疾病和症状	传播方式	突发原因
细菌、立克次氏体、衣原体			
炭疽杆菌（*Bacillus anthracis*）	炭疽热：呼吸疼痛，出血	吸入或接触芽孢	生物武器
布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdor jejuni*）	莱姆病：疹、发热、神经和心脏异常、关节炎	被感染的蜱咬伤	在森林里鹿和人口的增加
空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）	弯曲杆菌肠炎：腹痛、腹泻、发热	食入污染的食物、水或牛奶，感染的人或动物粪便与口部传播	发病数量增加，未熟禽类的消耗
砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）	砂眼、生殖器感染、结膜炎、小儿肺炎	性交	性行为增加，卫生条件的改变
大肠杆菌（*Escherichia coli* O157：H7）	出血性结肠炎、血小板减少症、溶血性尿毒症	食入污染的食物，尤其是半生的牛肉和生牛奶	新病原体的发展
流感嗜血菌埃及生物群（*Haemophilus influenzae biogroup aegyptus*）	巴西紫癜性热：化脓性结膜炎、发热、呕吐	感染人的排泄物，苍蝇是可能的载体	由于突变使毒力增加

续表

病菌	疾病和症状	传播方式	突发原因
细菌、立克次氏体，衣原体			
幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）	胃炎、胃溃疡、可能性的胃癌	污染的食物或水，尤其是未经巴斯德灭菌的牛奶或与宠物接触	发病数量的增加
侵肺军团菌（*Legionella pneumophila*）	军团菌病：不适、肌痛、发热、头痛、呼吸道病	空气制冷系统，水的供应	流行情况的出现
结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）	结核：咳嗽，体重减轻，肺损伤，感染扩散到其他器官、系统	疾病活动期的人，经咳嗽或喷嚏排出痰带菌颗粒	免疫抑制，免疫缺陷
脑膜炎奈瑟球菌（*Neisseria meningitidis*）	细菌性脑膜炎	人与人之间接触	都市化，地方公共卫生条件差
金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）	脓肿、肺炎、心内膜炎中毒性休克	与化脓性损伤或受伤个体接触	流行情况的出现，可能的突变
酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）	猩红热、风湿热、中毒性休克	与感染患者或携带者直接接触，食入污染的食物	细菌毒力的改变，可能突变
霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）	霍乱：严重腹泻，迅速脱水	水被感染个体的粪便污染，食物接触污染的水	卫生条件不洁，货船的污水
病毒			
登革热病毒	出血热	感染蚊子咬伤（起源于伊蚊）	对蚊子控制的失败，在热带地区都市化增加，空气传播增加
线状病毒（马尔堡病毒、博拉病毒）	暴发性疾病，高致死率，出血热	直接与感染的血液、器官、分泌物、精液接触	未知，在欧洲和美国病毒感染的猴从发展中国家运入，空气传播
Hendravirus病毒	人和马的呼吸系统和神经系统疾病	与感染的蝙蝠或马接触	人类破坏自然环境
汉坦病毒	腹痛、呕吐、出血热	吸入啮齿类尿和粪便的气溶胶物	人类干扰病毒的生态环境
肝炎病毒B	恶心、呕吐、黄疸、慢性感染导致肝细胞癌变和肝硬化	接触感染人的唾液、精液、血液、阴道分泌物，传播给儿童的方式不明	性交增加，滥用静脉注射药物，输血（1978年前）
肝炎病毒C	恶心、呕吐、黄疸、慢性感染导致肝细胞癌变和肝硬化	接触污染的血液或血浆，性传播	通过分子病毒学的应用确定病毒，输血，尤其在日本
肝炎病毒E	发热、腹痛、黄疸	污染的水	新发现
人类免疫缺陷病毒HIV-1和HIV-2	HIV疾病，包括AIDS：严重的免疫系统失调，机会性感染	与感染个体性接触或与血液或组织接触，垂直传播	都市化生活方式的改变，静脉注射药物的增加，国际旅游，医学技术（输血和移植）
乳头状瘤病毒	皮肤和黏膜损伤（寻常疣），与子宫颈和阴茎癌密切相关	直接接触（性接触或与污染表面接触）	新发现，或是性生活方式的改变
人类T细胞淋巴营养病毒（HTLV-Ⅰ和HTLV-Ⅱ）	白血病和淋巴瘤	通过血液或母乳垂直传播，或接触血制品，性传播	滥用静脉注射药物，医学技术（输血和移植）

续表

病菌	疾病和症状	传播方式	突发原因
病毒			
流感病毒	发热，头痛，咳嗽，肺炎	空气传播，尤其在拥挤、密闭的空间	动物-人的病毒重排，抗原漂移
拉沙病毒	发热，头痛，咽喉痛，恶心	与感染的啮齿类动物的尿、粪便接触	都市化，利于啮齿类动物侵染的条件
麻疹病毒	发热，结膜炎，咳嗽，红色斑和人的疹	空气传播，与感染个体的呼吸道分泌物直接接触	与公共免疫有关的健康基础遭到破坏
猴痘病毒	皮疹，淋巴结病，肺部疼痛	直接与感染的灵长类动物或其他宿主接触	到疾病流行区旅游，食用或者接触被感染的灵长类及其他宿主
Nipah 病毒	出血热	与马来群岛的蝙蝠和猪近距离接触	暴露于被感染的动物
诺沃克和诺沃克样因子	胃肠炎、流行性腹泻	大多为粪便-口的途径，包括：饮水、游泳池的水和未加工的食物	识别增加
狂犬病病毒	急性病毒性脑脊髓炎	狂怒动物咬伤	感染寄主的栖居地移到新的地区
裂谷热病毒	热病	感染蚊子的咬伤	感染蚊子或其他动物的输入，大坝或水利的发展
轮状病毒	肠炎：腹泻、呕吐、脱水、低热	主要是粪便-口的途径，粪便-呼吸传播也有发生	识别增加
严重急性呼吸系统综合征冠状病毒（SARS-CoV）	呼吸系统感染和肺炎	起源于人畜共患病，现在发展为人之间通过感染性液体传播	人畜共患病起源于猎捕野生动物（麝猫）
委内瑞拉马脑炎病毒	脑炎	感染蚊子咬伤	蚊子和寄主（马）的迁移
西尼罗河病毒	脑膜炎，脑炎	库蚊和鸟类宿主	农业发展，蚊子繁殖地区扩大，向未免疫人群的迅速传播
黄热病毒	发热，头痛，肌肉痛，恶心，呕吐	感染蚊子的咬伤	缺少有效的蚊子控制和广谱疫苗，热带都市化
原生动物和真菌			
假丝酵母属（*Candida*）	假丝病：胃肠道、阴道及口腔的真菌感染	内源性菌系，与感染个体的分泌物和排泄物接触	免疫抑制，医学管理和抗体的使用
隐球酵母属（*Cryptococcus*）	脑膜炎，有时会有肺、肾、前列腺、肝的感染	吸入	免疫抑制
原生动物（*Cryptosporidium*）	似隐孢菌病：胃肠和呼吸道上皮细胞感染	粪便-口途径，人到人水载体	靠近水域发育，免疫抑制
贾弟鞭毛虫（*Giardia lamblia*）	伦伯尔氏病：小肠上部感染、腹泻、胃胀气	摄取粪便污染的食物或水	缺乏水供应系统的控制，免疫抑制，国际旅行
小孢子虫（*Microsporidia*）	胃肠炎、腹泻、免疫抑制个体的乏力	未知，或许是摄取了粪便污染的食物或水	免疫抑制、识别
疟原虫（*Plasmodium*）	疟疾	感染按蚊的咬伤	都市化，寄生生物学的改变，环境改变，药物抵抗，空气传播
间质性浆细胞虫（*Pneumocystis carinii*）	急性肺炎	未知，也可能是潜伏性感染的再激发	免疫抑制

续表

病菌	疾病和症状	传播方式	突发原因
原生动物和真菌			
弓形虫（*Toxoplasma gondii*）	弓形虫病：发热、淋巴组织增生、淋巴细胞增多	于携带有原生动物的猫的粪便相接触，有时食物是载体	免疫抑制，宠物猫的增多
其他病菌			
牛海绵样脑病致病因子（Bovine prions）	牛海绵样脑炎（BSE，动物），Creutzfeld-Jacob 病（vCJD，人）	食物来源	食用被污染的牛肉

人们的行为，特别是人口聚集，导致了疾病的传播。性乱交及使用药物注射均是 AIDS 和肝炎传播的主要因素，尤其是在以城市为中心的地区（见 26.11 节和 26.14 节，图 25.6）。

尽管技术进步和工业发展对生活水平具有积极的影响，但有些时候它们也会导致疾病的传播。如 20 世纪的主要技术进步是在卫生保健领域。卫生保健环境，尤其是医院，已经引起医院获得性传染的剧增（见 25.7 节）。微生物中的抗生素抗性是现代卫生保健的又一负面作用，尤其是在发达的国家，万古霉素抗性的肠道球菌和多种药物抗性的肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）已经成为重要的新出现疾病。

运输、批量生产和分装已成为食品工业质量保证和营利的方式。然而，一旦健康措施失控，这些因素就会增加共源性传染的可能性。如在美国，一个肉类加工厂把大肠杆菌 O157：H7（表 25.8）传染给 4 个州的至少 500 人，最后，食物来源即碎牛肉，都被销毁，以防止疾病的蔓延，但有几人已经丧命（见 29.8 节）。由于国际间的旅行，SARS 由发病源——中国南部的一个城市广州迅速传播到 32 个国家（见 25.8 节）。

经济发展和土地利用的变化也加剧了疾病的传播。例如 1970 年，埃及修建了 Aswan High 坝后，一种蚊子传播的病毒性传染病立夫特山谷热就有所增加。该坝导致了 200 万英亩的水淹地形成，这就增加了蚊子在新的栖居地边缘区的繁殖。在 1977 年，埃及有大约 20 万人患立夫特山谷热，并有 598 人死亡。在那以后，又有几次暴发，这种病已成为栖居地附近的流行病。

Lyme 氏病是美国最普遍的由载体传播的传染病，由于土地利用的变化，该病的发生呈增长趋势。重新造林和随之带来的鹿数量增加［鹿是布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）的天然宿主］，使节肢动物蜱的感染在数量上也大为增加（见 27.4 节）。此外，由于越来越多的人在森林内或附近建造房屋或从事文娱活动，使得他们和感染性蜱的接触增多，从而增加了发病率。

国际旅行和商务也都影响病原体的传播。如一组 RNA 线状病毒 *Filoviridae*，能够引起宿主发烧，并最终发展为出血症。从根源来看，它们是不可治愈的，死亡率高于 20%。该类病暴发于赤道附近的中非国家，在那里它们的天然宿主还未确定，但其载体确实存在，潜在宿主来往的地区就会引起该病的传播。例如，这类病毒中的一种随同非洲进口的实验用绿猴传播到了德国的马尔堡，病毒很快从原始载体传染给人，第一批感染者有 25 人，后又有 6 例以上经他们传染而患病。这种马尔堡病毒 Marburg virus 导致 7 人死亡。另一艘船上的实验用猴将不同的线状病毒带到了美国弗吉尼亚的 Reston，

幸运的是这类病毒对人类不致病，但作为呼吸道传染方式，在 Reston，几天内 Reston 病毒就感染和杀死了大部分猴子。这两种线状病毒是与埃博拉（Ebola）病毒紧密相关的（表 25.8）。

在中非，偶然暴发的埃博拉病，死亡率达 50% 以上，免疫和治疗对高毒性病原体是无效的。这些病原体可在几天内通过空气传播到全世界。像 Reston 病毒这样高传染性呼吸系统病原体与埃博拉病毒一样具有高死亡率，在几周内，可导致世界范围内群体聚集区的毁灭。

微生物的适应性和变化也与病原体的复发有关。如包括流感病和 HIV 在内，几乎所有的 RNA 病毒都会发生遗传突变。RNA 病毒与大多数 DNA 病毒相比在复制过程缺少效正机制，因此在它们的基因组中以极高的频率发生突变。由于 RNA 病毒具有不断变化的基因组，所以它们是主要的流行病学问题。

细菌的遗传机制能增强毒性和促进新的流行病出现。可转移遗传因素如噬菌体、质粒和转座子（分别见于 16.1～16.5 节、10.9 节和 10.11 节）是增强毒性机制的一类。表 25.9 列出携带可转移遗传因素的一些毒性因子，这些毒性因子导致病原体的出现。

表 25.9 噬菌体、质粒和转座子编码的毒性因子

遗传元件	有机体	毒性因子
噬菌体	酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）	红斑毒素
	大肠杆菌（*Escherichia coli*）	志贺毒素
	金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）	肠毒素 A、D、E，葡萄球菌激酶，中毒性休克综合征毒素-1（TSST-1）
	肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）	神经毒素 C、D、E
	白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）	白喉毒素
质粒	大肠杆菌（*Escherichia coli*）	肠毒素、菌毛集群因子、溶血素、尿素酸血清抗性因子、黏附因子、细胞污染因子
	炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）	水肿因子、致死因子、保护性抗原、多聚-D-谷氨酸荚膜
	鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）	凝固酸、纤维蛋白溶酸、鼠性毒素
转座子	大肠杆菌（*Escherichia coli*）	热稳定肠毒素、好养菌素铁载体、溶血素和菌毛操纵子
	痢疾志贺氏菌（*Shigella dysenteriae*）	志贺毒素
	霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）	霍乱毒素

抗生素抗性是导致细菌性病原体复活和病毒出现的另一个因素（见 20.12 节）。尽管许多药物对某些病毒性疾病是很有效的（见 20.10 节），但对这些药物的抗性却是十分普遍的，特别是 RNA 病毒。例如，HIV 的许多株能够迅速形成对叠氮胸腺嘧啶核苷（AZT）的抗性，除非把该药与其他药物结合用（见 26.14 节）。

有时公共健康措施的破坏，也会引起新出现或复发的传染病。例如，即使在流行区，通过提供适当的污水处理和饮用水处理，霍乱（由 *Vibro cholerae* 引起；见 28.5 节）也能得到适当控制。但是，1991 年在秘鲁，城市供水污染导致霍乱暴发，而流行性霍乱在美国流行也是同样的情况（见 28.5 节）。1993 年，在威斯康星州密尔沃基市，城市供水被抗氯的原生动物（*Cryptosporidium*）污染，导致有超过 40 万个肠道病例发生，其中 4000 人需住院治疗。为消除城市供水中的病原体，需要加强水过滤系统（见 28.6 节）。

公共免疫计划的不足是引起一度已经控制疾病复发的重要潜在因素。例如，最近，前苏联暴发的白喉［由白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）引起］（见 26.3 节）是由于敏感儿童缺乏足够的免疫所致。而正是原先集中的公共健康基础结构的破坏造成了这一后果。百日咳［由百日咳博德特氏菌（*Bordetella pertussis*）引起，见 26.4 节］是另一种防止儿童呼吸道疾病的疫苗，该病最近在美国呈上升趋势，这是由于缺乏免疫和安于现状所引起的。由于缺乏及时有效的疫苗免疫方案，最近在美国麻疹患者有所增加。

最后介绍一下，由于异常的、自然发生的情况，导致宿主与病原体间平衡破坏的问题。例如，汉坦（Hanta）病毒是人们所熟悉的人类病原体，存在于许多啮齿动物中，甚至是实验室动物体内（见 27.2 节）。1993 年，在美国西南部，报道了许多汉坦病毒感染致死的病例，这可能与暴露野生动物的粪便有关。充足的雨量、长的生长季节和温暖的冬天使鼠量大幅度增加，从而增加了鼠与其粪便暴露感染的概率。

新出现疾病概述

我们讨论的许多新出现疾病已从美国官方的名单上消失了（表 25.5）。公共健康官员是怎样定义和处理它们，以至防止主要的流行病呢？对新出现疾病概述的关键点为疾病的确诊和防止疾病传播的措施。

确诊疾病后的第一步是预防。对那些具有特殊临床症状的传染性疾病要加强公共健康监控。这些症状为①急性呼吸系统疾病；②大脑炎和无菌性脑膜炎；③出血热；④急性腹泻；⑤集群性高热症；⑥异常集群性疾病或死亡症；⑦对常规药物或治疗产生的抗性。因此，一些新的疾病就可根据流行频率、集群性和症状而确诊。新出现疾病的流行性和病理学一旦被确认，它就会列入卫生当局的名单上。例如，AIDS 在 1981 年被确定，于 1984 年列入名单（表 25.5）；Lyme 氏病作为孤立的临床病症于 20 世纪 80 年代首次被确定，于 1991 年成为名单上一员；由肠道病原体大肠杆菌（*E. coli*）O157∶H7 引发的胃肠疾病在近些年有所增加，这一菌株于 1995 年列入名单。

预防新出现感染的传播需要一系列的公共健康措施。特殊疾病预防的关键是控制个体。特殊疾病暴发的区域内必须进行隔离、免疫和药物治疗。最后，对于那些载体传播和人兽互传的疾病，必须要确定其非人类宿主或载体，从而才能切断病原体的生命周期和阻止向人的转移。

概念检查

宿主或载体的变化、自然或人为导致的病原体状况的变化，都会导致传染性疾病。保持和加强全球性预防和干预措施，以防止新的、大规模的流行病和地方性传染病发生。

◆ 对于潜在病原体的新出现和复发来说，什么因素是重要的？

◆ 叙述有关处理可能出现和已经出现的新传染病的行之有效的、常规的具体方法。

25.12 生物战和生物武器

生物战（biological warfare）是指在战争中使用生物制剂使敌军或平民失去战斗力或被杀死的行为，以及恐怖行为。在美国，生物武器一直被用于防卫，武器制造设备在少数政府官员及恐怖分子的控制下。

生物武器的特征

生物武器（biological weapon）必须是生物体或者毒素，①易生产和运输；②可以被进攻士兵安全使用；③可以使敌军失去战斗力或被杀死；④并在攻击中具有可再生和持续性作用。许多生物体和生物毒素都符合这些普通标准，下面我们将就其中一些进行介绍。

虽然生物武器在国际战争中有使用的潜力，但是更有可能被恐怖分子所利用。这应部分归咎于在生物武器中使用的生物体可以有效并且低成本的生产和繁殖。几乎每一个国家的政府甚至富有的私人组织都可以拥有生物武器。

可选择的生物武器

实际上所有的病原微生物或者病毒都有可能成为生物武器，许多最有可能被选作生物武器的生物体都相当容易生长和传播。表 25.10 中列出了常被考虑用作生物武器的微生物。最常提到的生物武器是炭疽杆菌（*Bacillus anthracis*），它是炭疽热的病原体。下面我们介绍其他的生物武器。

表 25.10　潜在的生物恐怖制剂和其导致的疾病

细菌和立克次氏体病
炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）（炭疽）
布鲁氏菌（*Brucella* sp.）（布鲁氏菌病）
鼻疽伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia mallei*）（鼻疽病）
类鼻疽伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia pseudomallei*）（类鼻疽病）
鹦鹉热衣原体（*Chlamydia psittaci*）（鹦鹉热）
霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）霍乱
波特淋菌中毒（*Clostridium botulimum toxin*）（肉毒中毒[a]）
产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）（*Epsilon* 毒素[a]）
贝氏柯克斯体（*Coxiella burnetii*）（Q 热）
大肠杆菌（*Escherichia coli* O157：H7）（胃肠疾病）
土拉弗朗西斯菌（*Francisella tularensis*）（野兔病）
鼠疫耶尔氏杆菌（*Yersinia pestis*）（鼠疫）
葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）外毒素 B[a]
伤寒沙门氏菌（*Salmonella Typhi*）（伤寒）
沙门氏菌（*Salmonella* sp.）（沙门氏菌病）
志贺氏菌（*Shigella*）（志贺氏菌病）
普氏立克次氏体（*Rickettsia prowazekii*）（斑疹伤寒）
病毒
重型天花病毒（天花）

续表

病毒
Alpha 病毒（滤过性脑炎）
马脑炎病毒
东部马脑炎病毒
西部马脑炎病毒
Nipah 病毒
出血热病毒
丝状病毒；埃博拉，马尔堡沙粒病毒；拉沙，Machupo 汉坦病毒
原生动物
小似隐孢菌（*Cryptosporidium parvum*）（水传播肠胃炎）
植物
蓖麻（*Ricinus communis*）（蓖麻子中的蓖麻毒素）

a. 已有毒素；其他病原体都须感染。

来源：信息来源于美国芝加哥亚特兰大疾病防控中心。

其他一些重要的可选择的细菌生物武器包括耶尔森氏鼠疫杆菌（*Yersinia pestis*），它是鼠疫的病原体（见 27.7 节），布鲁氏菌（*Brucella abortus*；可引起布鲁氏菌出血热），土拉热弗朗西斯菌（*Francisella tularensis*；兔发热病）和沙门氏菌（*Salmonella*；水源和食物源疾病；见 29.7 节）。可能成为生物武器的病毒性病原体包括出血热病毒和脑炎病毒。这些生物引发的疾病可导致大量死亡，其中有许多具有较高的死亡率。

生物毒素如肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）产生的肉毒毒素也可能成为生物武器（见 21.10 节和 29.5 节，表 25.8）。大量的前体毒素通过普通的载体如饮水等传播给人群，导致破坏性的后果：肉毒毒素对人的致死剂量仅为 2μg，甚至更低。

天花

天花病毒（smallpox virus）（见 16.13 节）是一种具有潜在威胁性的生物武器，因为它可以方便地通过接触或气溶胶的形式传播，其死亡率高达 30%或更高。然而被用于生物武器的可能性较低，其原因是美国和俄罗斯严密保藏着仅存的天花病毒。但是，有限的保存病毒仍有可能被恐怖分子或者武装力量获得。由于存在这种可能性，美国政府规定医疗和公共安全人员必须免疫天花。虽然天花病毒的威胁是存在的，但是活的牛痘病毒疫苗自从 1977 年世界范围内野生天花病毒灭绝后，这 30 年中就很少使用了，而且这些疫苗会有一定的副作用。因此，现在世界上有 90%的人没有进行足够的免疫，对天花病毒具有易感性。为抵御天花潜在的攻击力，政府给特定人群进行免疫，包括与天花患者密切接触的人、直接调查护理或者运送天花患者的人员、在实验室从患者身上获得天花样本的研究人员，以及需要接触天花患者使用过的物品的后勤处人员等。

虽然免疫疫苗是很有效的，但也存在很大风险。正常的免疫反应是先形成脓包，当大脓痂 2～3 周脱落后留下小痂。许多接受免疫的人还会出现一些不太严重的副反应，通常包括发烧和皮疹。对于患有湿疹或其他一些慢性或急性皮肤病的人、心脏病患者、孕妇及一些免疫力低下的人，如一些使用类固醇药物抗炎的人和艾滋病患者，我们都不建议他们进行天花疫苗的免疫。

约千分之一接种疫苗的人会出现严重的并发症，如心肌炎和多形性红斑，这是一种

对疫苗的毒性反应或者过敏反应。湿疹患者偶尔会出现普通牛痘（系统牛痘感染）。更为严重的是威胁生命的和时有发生的进行性牛痘，特别是对于那些由于治疗或疾病引起免疫抑制的人。每 100 万人中就会有 1 或 2 个人因接种牛痘死亡。

生物武器的传播

大多数生物体都可以作为生物武器使用，它们可以通过气溶胶的形式传播，这就导致了简单、迅速的大范围扩散和感染。因此我们介绍一些暴露在气溶胶中的例子是很有意义的。

1962 年，一场天花大暴发于德国这个发达国家。一个德国工人从当时正流行天花的巴基斯坦回国后，被发现感染了天花。这个人马上被送到医院并隔离，但是患者咳嗽产生的气溶胶中携带有病毒，感染了 19 个已接种牛痘的人；至少有一个人死于感染。

在 2001 年的炭疽热袭击（见 25.12 节）之前，曾发生过有计划的生物恐怖袭击。1984 年，美国俄勒冈州山谷中恐怖分子在 10 个餐馆的色拉吧中以气溶胶的形式接种了鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）的培养物，结果导致这一地区 751 人发病，而在这之前这个地区每年沙门氏菌感染病例少于 10 例（见 29.7 节）。1995 年，一伙激进政治组织在日本地铁中释放沙林神经毒气，造成数人死亡，20 多人受伤。虽然这是化学武器，但这伙人也持有炭疽杆菌培养物、细菌培养基、无人驾驶飞机和喷雾液。根据战争策略，将释放的生物毒素如肉毒毒素或葡萄球菌肠毒素（表 25.5）传播给较大人群实际上是不现实的，因为大多数有效的毒素是蛋白质，当它们被常见的介质如饮用水等稀释或破坏后会失去活力。但是毒素的传播可以针对个人或小范围人群，甚至可以随机的释放，从而易在人群中造成恐慌。

预防和抵抗生物武器

定期出台的对抗生物武器的措施，更新了 1972 年前期制定的国际生物和毒素武器公约。第五次也就是最近一次修订是在 2002 年。在实践过程中，各国政府都在大力生产和分发疫苗，并制定发展战略和战术计划来防止和消除生物武器的影响。

美国政府通过 CDC 通告并加强选择制剂项目监控系统，用来监控生物恐怖制剂的储备和使用。CDC 实验室响应网和健康警报网联合加强诊断能力，以及提高地方健康中心当出现病例时快速鉴定生物袭击事件的能力。

概念检查

生物恐怖袭击在国际间很容易传播，并且技术信息很容易获得，它是威胁整个世界的行为。生物制剂可以被当代军队和恐怖组织作为武器利用。气溶胶、食物和水源等都是常用的接种方式。预防和消除措施依靠良好的公共健康基层工作。

◆ 什么样的特点使得病原体或其产物可被用作生物武器？

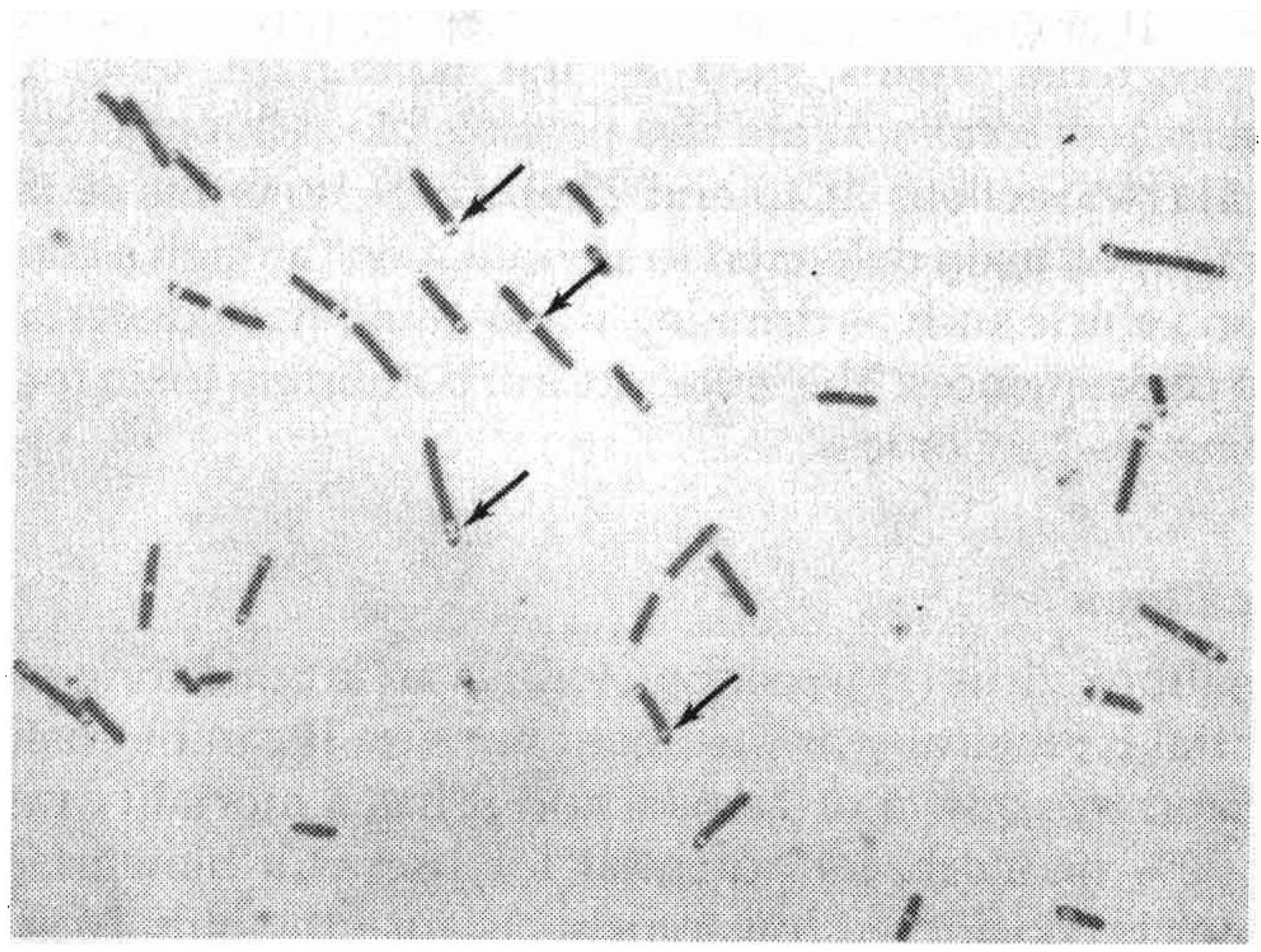
◆ 指出两种可被用作生物武器的病原体。它们是如何传播的？

25.13 生物武器——炭疽热

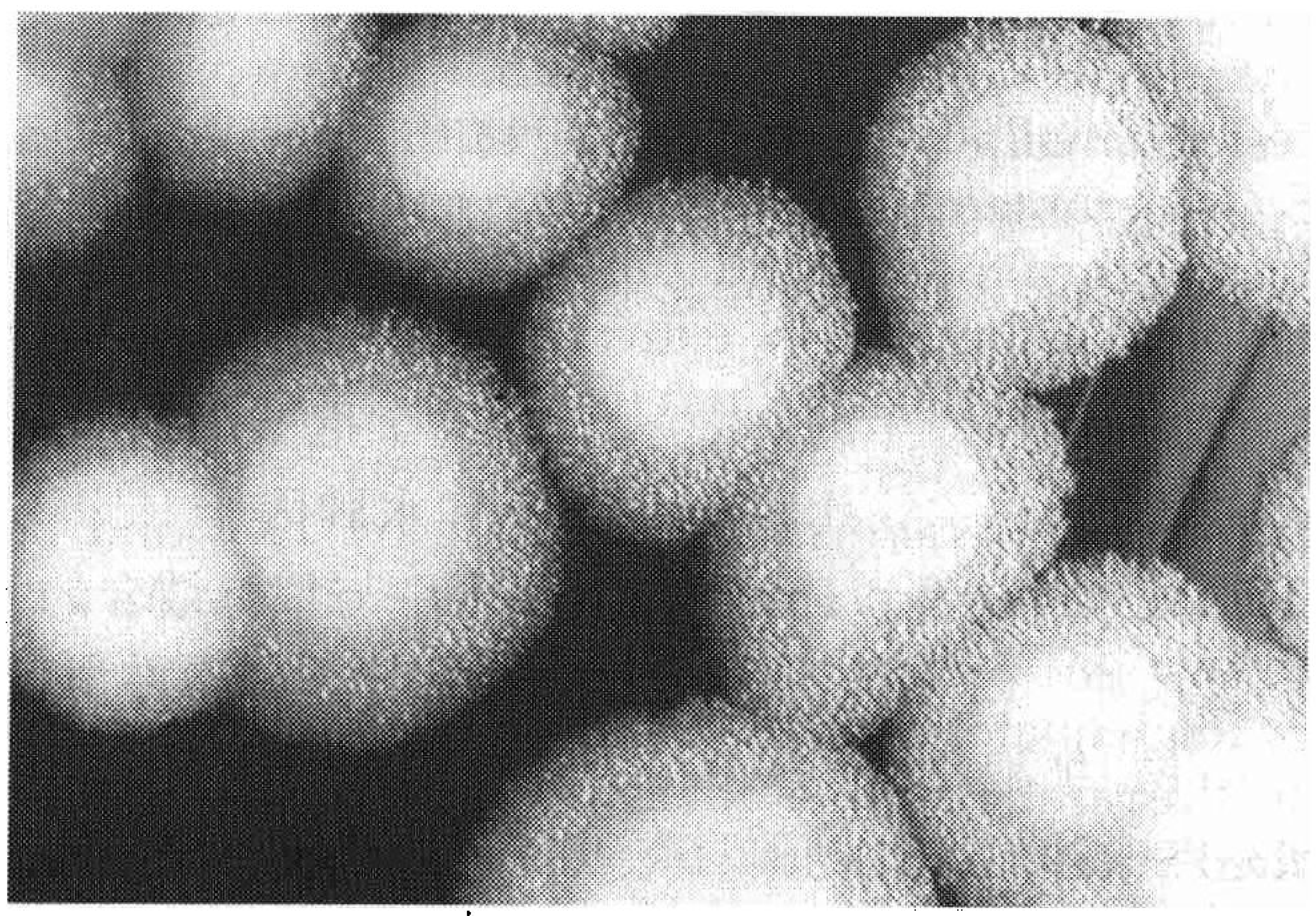
炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）是一种用于生物武器和生物恐怖活动的首选制剂。这里我们对它的特性、引起的疾病及其预防、诊断和治疗的方法进行讨论。

生物学和生长

炭疽芽孢杆菌是普遍存在于土壤中的腐生菌。它是一种好氧的革兰氏阳性棒状菌，直径约 1μm，长 3～4μm。与棒状菌属的其他种类一样，它可以产生芽孢以抵御高温和干燥（见 4.13 节和 12.20 节；图 25.12a）。活性芽孢有时在被污染的动物产品（如皮



(a)



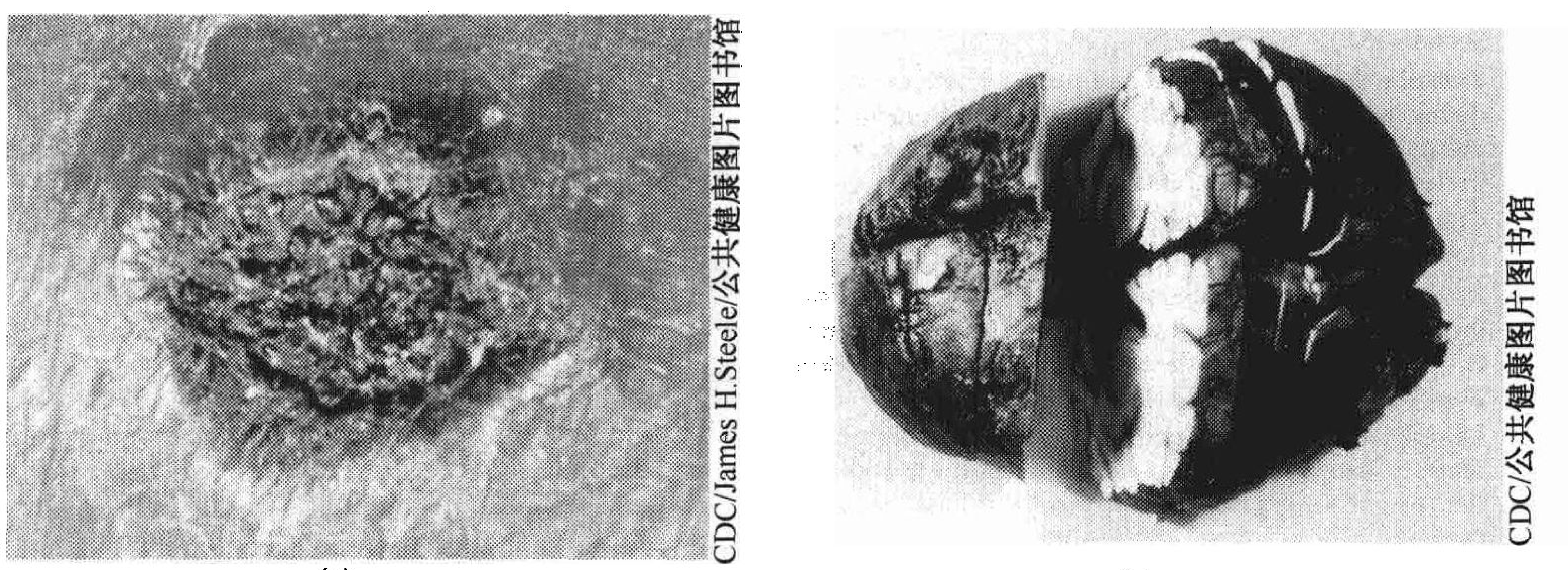
(b)

图 25.12　炭疽芽孢杆菌。(a) 炭疽芽孢杆菌（*B. anthracis*）是可形成芽孢的革兰氏阳性棒状菌（见 12.20 节），直径约 1μm，长 3～4μm。图中箭头指示芽孢形成。芽孢形成（见 4.13 节）加强了炭疽芽孢杆菌在气溶胶中传播的能力。(b) 在血液琼脂培养基上的炭疽芽孢杆菌菌落。非溶血性菌落呈平面毛玻璃状。

毛等）中复苏，在血液琼脂上生长形成平面毛玻璃样大菌落（图 25.12b)。菌株具有多聚-D-谷氨酸外膜，保护其不被吞噬破坏（见 21.6 节）。

感染和发病机制

炭疽芽孢杆菌的芽孢是引起炭疽热的原因。这种疾病通常感染家养动物特别是有蹄类动物，如牛、绵羊和山羊等。在动物中受感染的个体相当多，但其数量尚未知。动物从牧场的植物或土壤中感染此疾病。人和动物接触到炭疽芽孢杆菌可引起三种疾病。当皮肤磨损处被炭疽杆菌芽孢感染时，可引起皮肤炭疽热（图 25.13a)；食用了被炭疽杆菌芽孢污染的植物或者感染炭疽热的动物后，可引起胃肠道炭疽热，人类胃肠道炭疽热很罕见；当吸入炭疽杆菌芽孢后，可引起肺部炭疽热。吸入炭疽芽孢杆菌芽孢或者活的菌体可引起肺部感染，其特点是肺部和脑部出血（图 25.13b)。不接受治疗的肺部炭疽热病例的死亡率接近 100%。皮肤炭疽热在美国很少见，肺部炭疽热即使在农场工人中也很少见。最后一例自然引起的肺部炭疽热病例发生于 1976 年。但是 2001 年在美国，由于生物恐怖事件检出若干例肺部炭疽热。



(a) (b)

图 25.13 炭疽热。(a) 皮肤炭疽热。一个患者前肢变黑损伤，直径约 2cm，是由组织坏疽引起的。皮肤炭疽即使不治疗也是局部的非致死性感染。(b) 吸入炭疽热。脑固定切片显示出血性脑膜炎（黑色部分），是由吸入性致死炭疽热引起的。

发病是由于吸入了致病毒株产生的 8000～50 000 个孢子。致病炭疽芽孢杆菌产生三种蛋白质，保护性抗原（PA)、致死因子（LF）和水肿因子（EF)。PA 和 LF 形成致死毒素，PA 和 EF 形成水肿毒素。PA 是 A-B 毒素中与细胞结合的 B 组分（见 21.10 节和表 21.4)。EF 引起水肿，LF 引起细胞死亡。炭疽芽孢杆菌在淋巴结和淋巴组织中生长，进入肺部导致水肿和细胞死亡，最后导致组织破坏、休克和死亡。

最初的临床症状是咽喉肿痛、发烧和肌肉酸痛，几天后症状发展为呼吸困难，随后全身性休克。即使仅怀疑接触过致病菌株，死亡率就可达 90%。如果确定接触过致病菌株，又在初期症状出现前或出现时没有给予治疗，其死亡率达 100%。

炭疽热武器

炭疽热武器是指使用菌株或者炭疽芽孢杆菌制剂，通常是芽孢的形式，这可以加强

其传播能力，使之更有利于作为生物武器。第二次世界大战后期，一些政府对这样的菌株制剂进行了改进，但是公然开发新型生物武器的行为被 1972 年的国际公约所终止。小的微粒是炭疽热武器的物理特征之一，可以混合在滑石粉等细微粉末中传播，如此小的微粒保证了它可以轻易地通过空气传播。因此打开装有芽孢的信封或者将孢子粉末混合物释放到通风系统中和其他空气交换系统中，都可能污染周边空气，并感染此环境中的员工。

2001 年一些生物恐怖袭击者用生物武器炭疽热袭击了美国。这个事件是由带有炭疽热孢子的信封或包裹引起的。该袭击很明显是针对新闻媒体佛罗里达和政府（华盛顿特区）的。第三次袭击的地区是宾夕法尼亚-新泽西-纽约地区，虽然这次袭击没有明显的单一袭击目标，但其破坏了东北部的邮政服务，一些被炭疽热污染的邮政设施直到 2003 年仍不能使用。在这次事件中共有 22 人感染炭疽热。其中 13 人是皮肤炭疽热，在 7 例吸入炭疽热中 5 例死亡。制造这次生物袭击的恐怖分子一直没有被找到。

在美国发生的事件，并不是首次也不是最严重的炭疽热生物武器感染。在这之前，1979 年俄罗斯斯维尔德洛夫斯克的生物武器机构将大量的炭疽芽孢杆菌芽孢释放到大气中。他们释放了不到 1g 的孢子，在诊断到第一例炭疽热患者后，周边地区的所有人都接受了免疫或预防性抗生素治疗。但是仍有 77 人感染了肺部炭疽热，其中 66 人死亡。

免疫、预防、治疗和诊断

对炭疽热的免疫仅限于那些被认为具有高危感染率的人群，包括畜牧场工作人员和军人。现在的疫苗被称为 AVA（anthrax vaccine adsorbed，吸附炭疽热疫苗），是从炭疽芽孢杆菌培养物的无细胞滤液中获得的。治疗感染时间最短，仅需 8 天，通常使用抗生素治疗。环丙诺氟沙星（ciprofloxacin）是一种广谱对苯二酚抗生素（见 20.19 节），用于青霉素抗性菌感染的治疗。环丙诺氟沙星也可作为预防用药。

利用一些快速诊断方法可以检测到细菌的孢子。但是对炭疽芽孢杆菌的阳性检出还要依靠培养技术对被感染的组织和培养物进行直接的观察。在血液琼脂培养基上呈平面毛玻璃状，并且外形呈杆状的革兰氏阳性菌，呈链状生长（图 25.12）。

概念检查

炭疽芽孢杆菌是一种很重要的病原体，因为它可以作为生物武器。高感染率的芽孢被用作生物恐怖袭击武器。在不治疗的情况下吸入炭疽热的致死率约 90%。有效的治疗依靠迅速的发现和症状诊断。但是治疗并不能保证吸入炭疽热患者都能存活。

- 什么因素使得炭疽芽孢杆菌成为一种生物武器?
- 阐述你如何确定并治疗炭疽芽孢杆菌生物恐怖袭击的步骤。

复习题

1. 列出 5 种最常见的引起世界传染病致死的主要原因。这些疾病都可以通过免疫来预

防吗？（见 25.1 节）
2. 在传染病领域中，区分死亡率和发病率，流行和随机发生，流行和大流行的定义。（见 25.2 节）
3. 解释传染病的慢性/急性携带者的区别。（见 25.3 节）
4. 试举例：①宿主间直接传染；②宿主间间接传染。（见 25.4 节）
5. 群体中大部分的免疫人群是如何保护群体中未被免疫者免受感染的？这个免疫群体能共用水源等公共资源吗？为什么？（见 25.5 节）
6. 指出美国 HIV 感染的主要致病因素，在所有地区都是这种形式吗？（见 25.6 节）
7. 对于传染病的传播，医院是非常危险的环境，复习一下医院加速传播疾病的原因。大多数医院感染的原因是什么？（见 25.7 节）
8. 描述 SARS 的根源、病原体和治疗方法。SARS 具有成为潜在流行病的特性吗？（见 25.8 节）
9. 描述 20 世纪发达国家为了控制传染病的蔓延而采取的公共健康措施。（见 25.9 节）
10. 将发展中/发达国家传染病的死亡状况做一比较。（见 25.10 节）
11. 复习新传染病新出现的主要原因和对控制新传染病出现所采取的措施。（见 25.11 节）
12. 描述有效的生物战武器，应具备怎样的特点。天花是如何符合上述特点的？说明其他一些可以成为生物武器的生物体的特点。（见 25.12 节）
13. 描述炭疽杆菌如何作为生物武器使用。制定一个计划保护你自己不被炭疽杆菌攻击。（见 25.13 节）

应用题

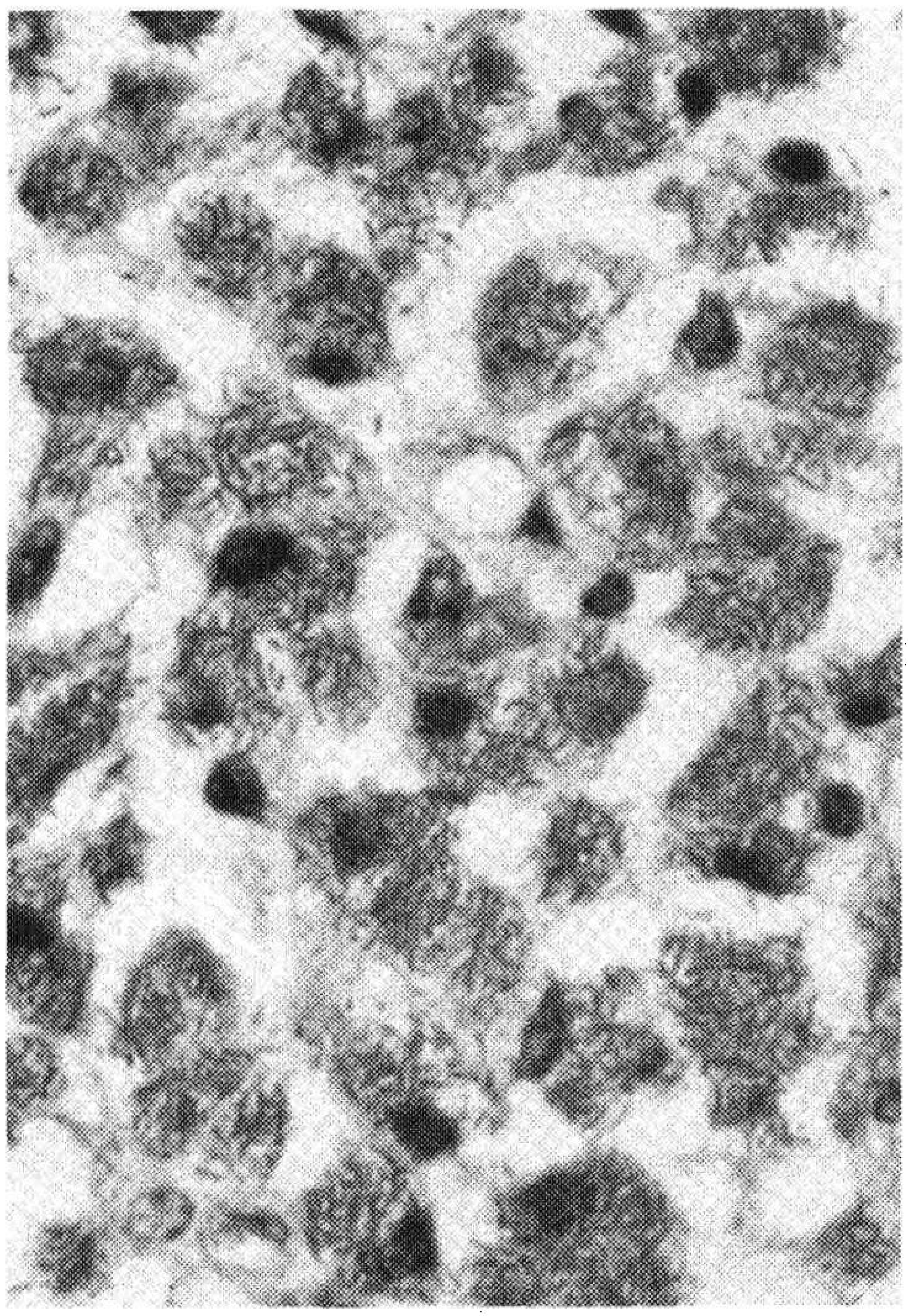
1. 天花是一种人类特有疾病，已经灭绝。鼠疫是一种啮齿类动物中的人畜共患病（表 25.2），永远不能被消除。解释这个观点并说明你认为在全球范围内是否可以消除鼠疫。制定一个计划在有限的空间中，如一个镇或一个城市中消灭鼠疫，需要考虑到的方面包括传染源、病原体和宿主。
2. 获得性免疫缺陷综合征（AIDS）是一种可能被消除的疾病，因为它靠人与人之间的接触传播，尚未知动物传染源。分别设计针对发达国家和发展中国家消除艾滋病的方案。这些方案的特点是什么？考虑到人类行为和艾滋病病毒本身，什么因素可能阻碍你的计划？特别是在发展中国家，为什么艾滋病病毒感染者和艾滋病患者持续增加？
3. 到发展中国家去旅游不可避免会暴露在一些疾病感染环境中。你去之前、到达后及旅游归来后，应该有那些基本注意事项？你在哪里可以获得有关要抵达国家感染性疾病的情况？解释当你归国后是否会成为威胁家人和同事健康的疾病携带者？
4. 鉴定一种特殊病原体是否适合成为有效的生物武器。描述本章中提到的病原体作为生物武器使用的适宜性。说明病原体大量繁殖的条件是什么。确定一种适合传播的方式。如果你要繁殖并传播一种病原体，那么你要如何对自己采取保护措施。现在

转变你的立场。作为一个大城市公共健康机构人员，你将如何识别和诊断由病原体引起的疾病，并表明你治疗疾病的措施。你如何将损伤降到最低？检疫和隔离是最有效的方法吗？免疫和抗生素呢？

（刘　方　译，杨文博　校）

26

人与人之间传染的微生物疾病



利用病菌被抗酸染色法染成红色的特征辨别和鉴定组织或痰样本中的分枝杆菌感染。

词汇表

抗原性漂变（antigenic drift）：由于流感病毒基因突变而引起的抗原微小变化

抗原性转变（antigenic shift）：由于流感病毒基因再分配而引起的抗原较大变化

肝硬化（cirrhosis）：正常肝脏结构被破坏而造成的纤维化

先天性梅毒（congenital syphilis）：婴儿出生时从母亲那里获得的梅毒

融合抑制剂（fusion inhibitor）：一种合成的能够与病毒糖蛋白结合的多肽，抑制病毒与宿主细胞膜的融合

肝炎（hepatitis）：一般由传染物引起的肝脏炎症

黄疸（jaundice）：由于肝细胞的破坏，肝脏中产生和释放过多胆红素，造成皮肤发黄和眼睛变白

脑膜炎（meningitis）：脑膜（脑组织）炎症，有时由脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）引起，表现为突然发作的头疼、呕吐、脖颈僵硬，通常数小时内昏迷

脑膜炎球菌血症（meningococcemia）：脑膜炎奈瑟氏球菌引起的暴发性疾病，表现为败血症、血管内凝血和休克

非核苷反转录酶抑制剂（non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor，NNRTI）：一种非核苷类化合物，通过与病毒逆转录酶催化部位的直接结合抑制其作用

核苷反转录酶抑制剂（nucleoside reverse transcriptase inhibitor，NRTI）：一种与核苷类似的化合物，通过与核苷竞争抑制病毒逆转录酶的作用

机会感染（opportunistic infection）：通常只在免疫系统功能障碍的个体中才发生的感染

蛋白酶抑制剂（protease inhibitor）：一种化合物，通过与催化位点直接结合抑制病毒蛋白酶的作用，阻止病毒的蛋白质加工

风湿热（rheumatic fever）：由酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）感染，产生免疫反应，从而引起的一种炎症性自身免疫疾病

猩红热（scarlet fever）：由酿脓链球菌产生的外毒素而引起的特征性红疹

性传播的感染（sexually transmitted infection，STI）：通常由于性接触而传播的感染

中毒性休克综合征（toxic shock syndrome，TSS）：由宿主抗金黄色葡萄球菌外毒素而引起的急性系统性休克

结核菌素试验（tuberculin test）：一种用于检测以前有无结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）感染的皮试

病毒量（viral load）：定量评估宿主机体内，通常是血液中的病毒数量

自然界中存在 50 多万微生物物种（第 11 章），但是只有几百种致病。大多数微生物进行着不与其他生物产生相互作用的必要活动，有一些微生物与动植物有着稳定的、有益的联系（第 19 章）。然而，致病微生物对宿主生物有非常消极的影响。在随后的 4 章中，将要详述各种代表性的人类病原体及其生物学特征，并涉及相应的病理、诊断、治疗和疾病的预防等问题，介绍病原体的传播方式（mode of transmission）并提出与病原体生态学有关的传染性疾病。本章中疾病的传播方式是直接通过人类的互动（per-

son-to-person)，第 27 章至 29 章中，疾病的传播是通过动物、节肢动物或普通的媒介，如土壤、水或食物来进行。

按照病原体的传播方式及引起的疾病类型可以在无关的生物之间建立关联。例如，流感病毒和链球菌，虽然病原体明显不同，一个是病毒一个是细菌，但引起的疾病有部分相同的症状。这里我们将人与人之间通过呼吸传播的病原体归类进行讨论。采用此种方式，虽然具有生物学多样性，但生态学和病理学不同的病原体之间可以建立关联。

Ⅰ 空气传播的疾病

图 26.1 所示的诸如由喷嚏产生的气溶胶对于许多传染病在人群中的传播很重要，大多数的呼吸道疾病几乎无一例外地由此种方式传播。例如，结核分枝杆菌依靠此途径至少感染了世界人口的 1/3（见 25.1 节）；流感和感冒病毒侵入呼吸系统的情况非常普遍，实际上每年每人都要得一次以上的感冒或流感。

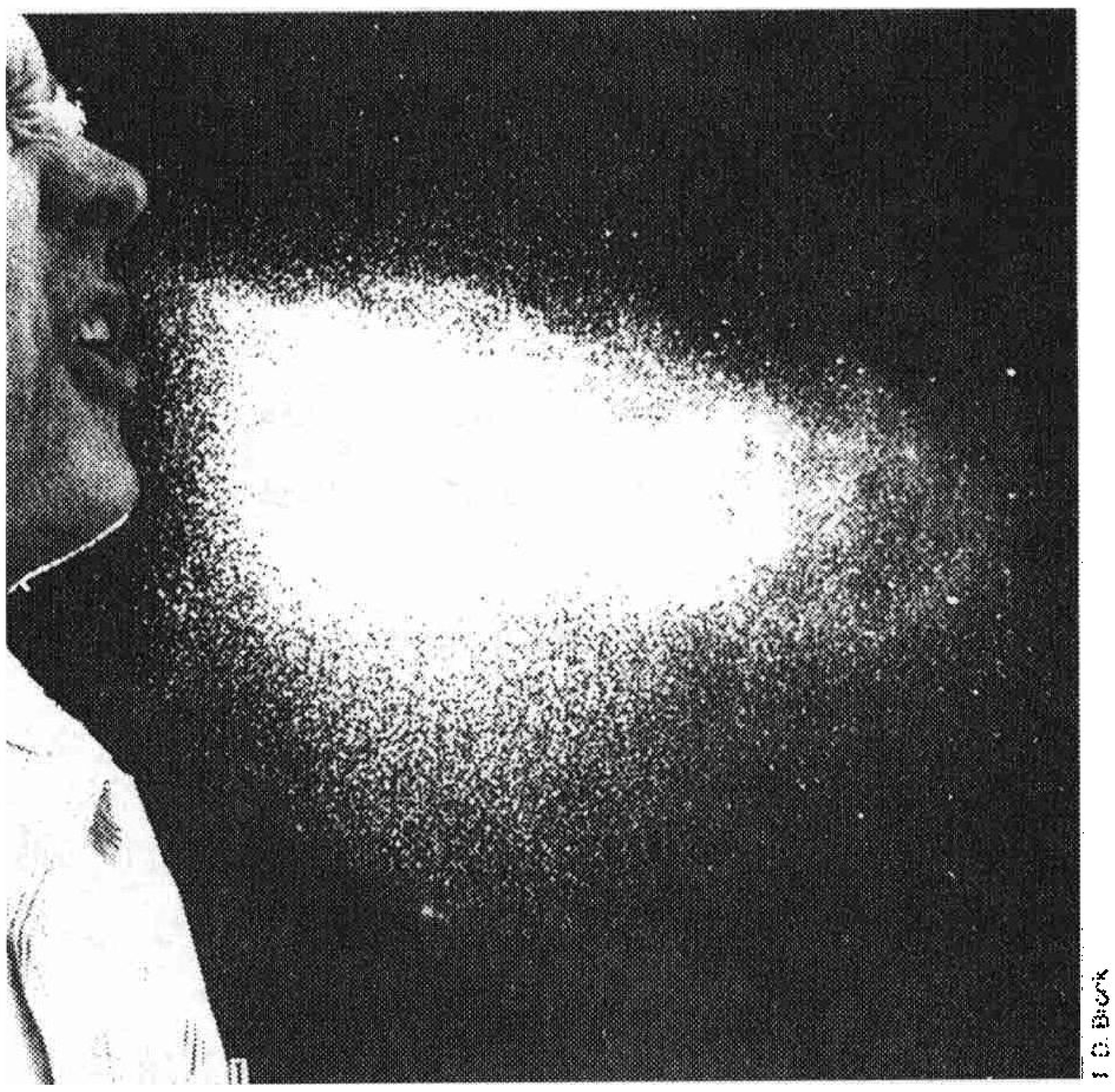


图 26.1　一个开放性喷嚏的高速照片。

26.1 空气传播的病原体

空气并不是微生物生长的媒介。在空气中发现的微生物大多数来自土壤、水、植物、动物、人或其他来源。在外界空气中，土壤微生物占较大的比重。室内的微生物数量明显高于室外，尤其是来自人类呼吸道的微生物。

大多数微生物在空气中难以存活，仅能够在短程内有效地传播给另一个人。不过某些人类病原体［如葡萄球菌（*Staphylococcus*）、链球菌（*Streptococcus*）］能在干燥的条件下比较好地生存，而且可以在尘土中存活很长一段时间。革兰氏阳性菌由于具有厚

而坚硬的细胞壁，因此一般比阴性细菌更加耐受干燥。同样，分枝杆菌细胞壁的蜡质层（见 25.6 节）也可抵抗干燥。产芽孢细菌（*Bacteria*）的芽孢对干燥的抵抗能力极强，但通常不能以芽孢的形式在人类中传播。

在打喷嚏时大量的液滴被排出体外（图 26.1），就是在咳嗽或说话时也会有相当数量的液滴排放。每个感染性的小滴大约 10μm 大小，包括 1 或 2 个微生物细胞或病毒颗粒。喷嚏的小滴的初速为大约 100m/s（大于 200 英里/h），咳嗽或喊叫时为 16～48m/s。在一次喷嚏中的细菌含量为 10 000～100 000 个。由于液滴非常小，所以水分会很快蒸发，剩下有机质与黏液供细胞附着。

呼吸道感染

人一生大约呼吸 5 亿升的空气，大部分包含载有微生物的尘粒，这是呼吸道感染原菌的潜在来源。空气在呼吸道中移动的速率不是恒定的，在下呼吸道中速率十分缓慢。当空气流动的速率减慢时，颗粒就会停下来附着。大颗粒首先落下，然后是小颗粒，只有小于 3μm 的颗粒才能到达下呼吸道的细支气管（图 26.2）。当然，大部分的病原体远小于 3μm，并且不同微生物生存在呼吸道特定的不同位置，这取决于每种病原体独特的代谢需求和关联的毒力因子。上呼吸道和下呼吸道提供截然不同的环境，适合于不同的微生物。

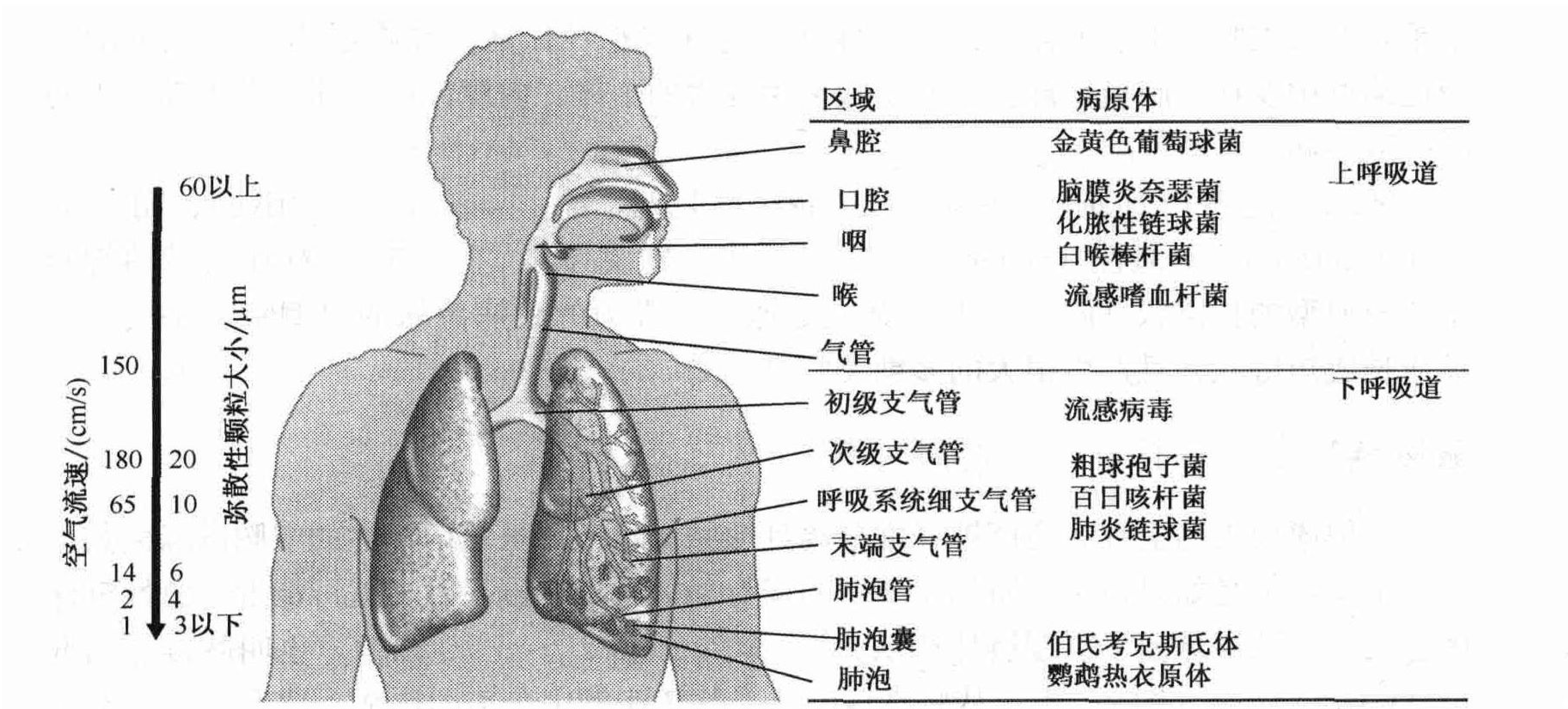


图 26.2　人类的呼吸系统。所标出的是致病微生物通常起始感染的部位。

细菌性呼吸道病原体

我们首先介绍一些普通的细菌性呼吸道病原体，然后再介绍病毒性呼吸道病原体及其引起的治疗和预防要困难得多的疾病。

大多数感染呼吸道的细菌病原体仅存于人类并且通过人群传播。既然人类是唯一的储存宿主（reservoir），这些病原体的存续依赖人与人之间的传播。少数呼吸道病原体如侵肺军团菌（*Legionella pneumophila*）主要通过水和土壤传播，不依赖于人的传

播，我们将随后介绍（第 28 章）。如上所述，众多人与人之间传播的呼吸道病原体是革兰氏阳性菌。当细菌性呼吸道感染严重时，通常引起可能危及生命的继发问题，因此，准确快速地诊断和治疗细菌性呼吸道感染对于减少宿主的损伤很必要。值得欣慰的是，大多数细菌性呼吸道病原体对抗生素治疗的反应良好，并且很多也可以被免疫系统控制。

概念检查

许多呼吸道病原体是革兰氏阳性菌。由于革兰氏阳性菌耐干燥，因此易于在空气中传播。大多数的呼吸道病原体通过咳嗽、喷嚏、说话和呼吸形成的气溶胶在人与人之间传播。

◆ 革兰氏阳性菌何种物理特征使得它们能够长期在空气中和尘粒上生存?
◆ 区别哪些病原体常见于上呼吸道，哪些更常见于下呼吸道。

26.2 链球菌疾病

酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）和肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）是重要的人类呼吸道病原体。酿脓链球菌通过呼吸途径传播，在将近 40%健康人的呼吸道菌群中发现了肺炎链球菌。对于缺乏免疫力的个体，内源性的菌株则会引起严重的呼吸道疾病。

链球菌是不产芽孢（nonsporulating）、同型发酵（homofermentative）、耐氧的（aerotolerant）、厌氧性（anaerobic）革兰氏阳性球菌（见 12.19 节）。酿脓链球菌细胞生长成典型的长链状（图 12.54）。肺炎链球菌有毒力的致病菌株的典型特征是成对生长或长成短链状并且产生很大的多糖荚膜（图 26.3）。

酿脓链球菌：流行病学和发病机制

在健康成人的上呼吸道能够经常分离到酿脓链球菌。虽然内源性的酿脓链球菌数量通常很少，但是如果宿主的防御系统变弱或有新的强毒株侵入时，就可能发生急性链球菌感染。酿脓链球菌可引起链球菌咽炎（*Streptococcal pharyngitis*），也叫脓毒性咽喉炎（strep throat，图 26.2）。从脓毒性咽喉炎临床病例中分离的产物，含有能溶解红细胞的毒素，这一作用称为β溶血（β hemolysis，图 21.18）。链球菌咽炎的特征是严重的咽喉痛（sore throat）、扁桃体肿大（enlarged tonsils）并有渗出物（tonsillar exudate）、颈部淋巴结触痛（tender cervical lymph nodes）、低烧（mild fever）和全身不适（general malaise）。酿脓链球菌还可以引起相关的感染，如内耳中耳炎（otitis media）、乳腺（mammary gland）（乳腺炎 mastitis）感染，而且感染皮肤浅层，引起脓疱病（impetigo）（脓疱病也可以由金黄色葡萄球菌引起）（图 26.4）。

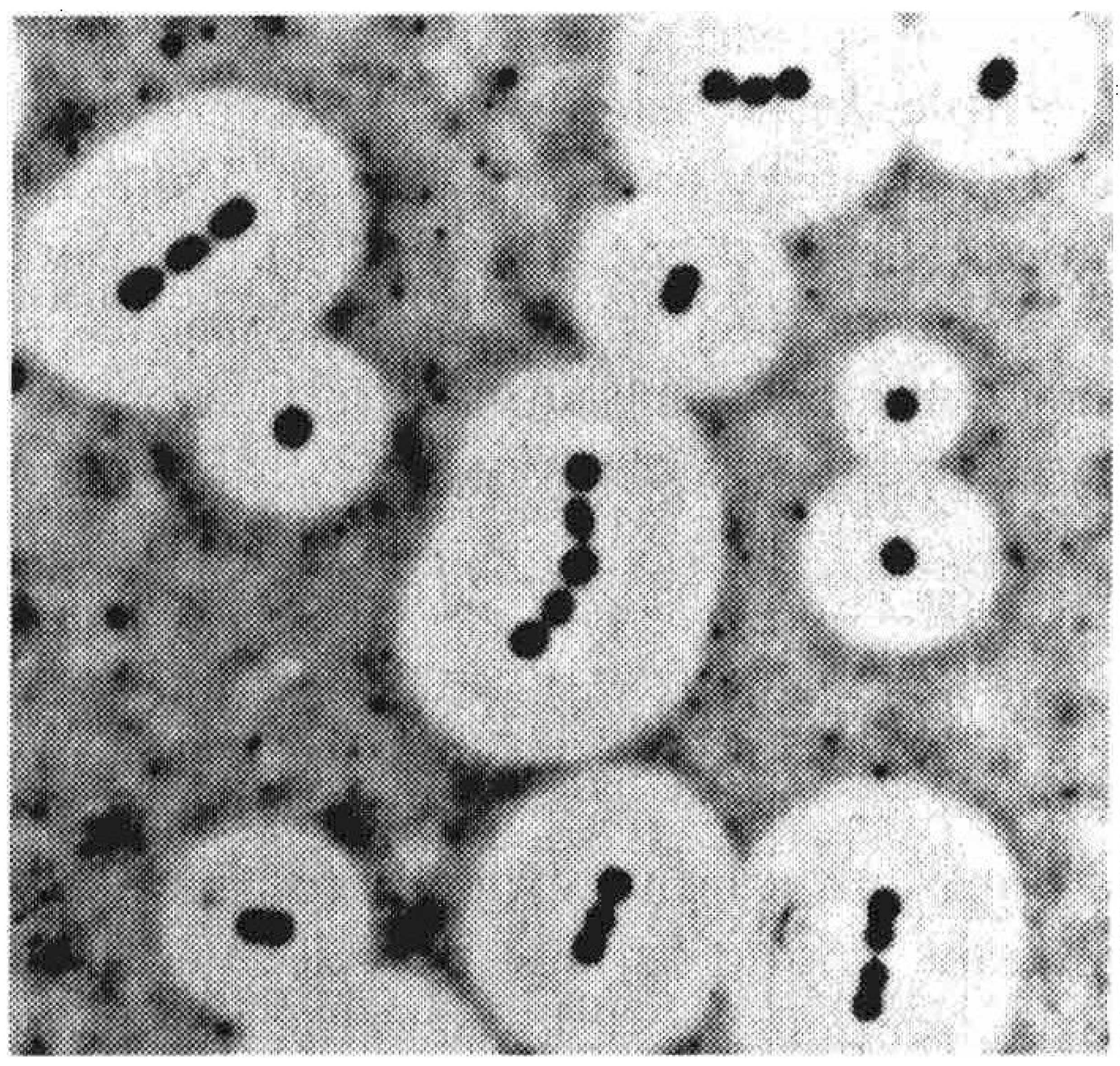


图 26.3　印度墨汁负染的肺炎链球菌细胞标本。注意细胞外围有一个很大的荚膜。细胞直径大约 0.5μm。

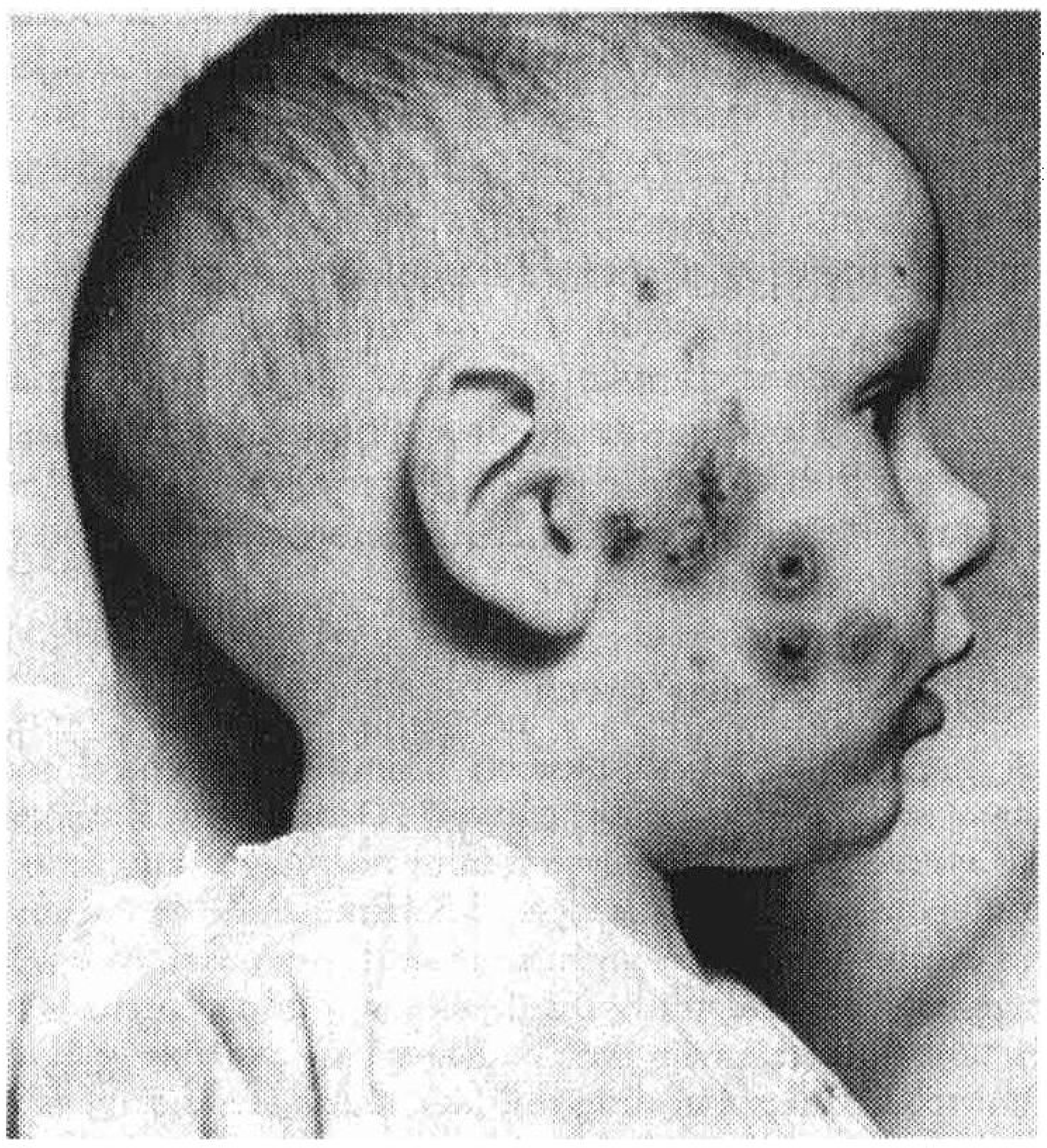


图 26.4　典型的脓疱病创伤。脓疱病通常是由酿脓链球菌或金黄色葡萄球菌引起。

大约一半的严重喉痛的临床病例是由酿脓链球菌引起的，其余的由病毒引起。准确、及时的诊断十分重要，因为如果咽喉炎是由病毒引起的话，使用抗细菌药物（抗生素）是无效的；如果是酿脓链球菌引起的，则应当立即使用抗生素治疗。快速完全地医治酿脓链球菌咽喉炎非常重要，这是因为该炎症有时会导致更严重的链球菌综合征，如猩红热（scarlet fever）、风湿热（rheumatic fever）、急性肾小球肾炎（acute glomerulonephritis）和链球菌中毒性休克综合征（streptococcal toxic shock syndrome）。

某些酿脓链球菌的菌株携带有溶原性噬菌体，编码链球菌致热性外毒素（pyrogenic exotoxin）A，这是一种与链球菌中毒性休克综合征及猩红热的大部分症状有关的外毒素。外毒素 A 是一种超抗原（superantigen），能够募集（recruit）大量的 T 细胞到达被感染的组织（见 22.16 节）。T 细胞分泌细胞因子（cytokine）激活大量的效应细胞，导致系统性炎症和组织损伤。术语链球菌中毒性休克综合征就是指这一系统性的、通常有生命危险的情形。外毒素 A 和相关的外毒素 C 还能够引起猩红热的粉红色斑疹向全身扩散（图 26.5），并会损伤小血管引起发烧。



图 26.5　猩红热。酿脓链球菌的红斑毒素作用产生典型的猩红热斑疹。

有时酿脓链球菌会导致暴发性的系统感

染，常以坏死性筋膜炎（necrotizing fasciitis）为标志，是一种快速、递增的疾病，造成皮下组织大范围的损伤。这种感染很恐怖，不过好在比较罕见，曾被称作食肉细菌（flesh-eating bacteria）。这种情况下，外毒素 A、B 和表面 M 蛋白充当超抗原，所导致的炎症和大范围的组织损伤在近 30%的病例中会引起死亡。不管怎样，成功地治疗链球菌感染可以终止超抗原的产生并消除其影响。

未经治疗或未完全治愈的酿脓链球菌感染会导致严重的后遗症（delayed sequelae）或并发症。风湿热（rheumatic fever）就是后遗症的一种，由酿脓链球菌中的致风湿性菌株（rheumatogenic strain）引起，该菌株的细胞表面抗原与人类某些细胞表面抗原相似。当免疫系统对侵入的病原体产生应答时，抗体与宿主的组织发生交叉反应，特别是在心脏、关节和肾脏，造成组织损伤。实际上，风湿热属于自身免疫疾病——抗体与自身抗原发生反应（见 22.15 节）。这种损伤可能是永久的，而且通常会因为后期链球菌感染造成的风湿热复发而加剧。

另一种酿脓链球菌感染引起的后遗症是急性肾小球肾炎（acute glomerulonephritis），一种痛苦的肾病。这是一种免疫复合病（见 22.15 节），由在血液中形成链球菌抗原抗体复合物造成。这些免疫复合物沉积在肾小球（glomeruli）或滤过膜上，造成肾炎（nephritis）反应，并伴随剧烈疼痛。通常几天以内这些复合物就会溶解，患者很快恢复正常。不幸的是，即使及时的抗生素治疗也无法阻止急性肾小球肾炎的发生，不过仅有少数酿脓链球菌致肾炎菌株（nephritogenic strain）才会引起这种疼痛的疾病。

既然感染引起菌株特异性的免疫，那么由特定的酿脓链球菌菌株造成的再次感染就是罕见的。然而，由独特的细胞表面 M 蛋白定义的菌株超过 60 种，这样就有由不同菌株造成多次感染的可能，没有抗酿脓链球菌感染的有效疫苗。

酿脓链球菌的诊断

由于酿脓链球菌咽喉炎能够造成宿主严重的损伤，人们开发了多种快速的抗原检测（rapid antigen detection，RAD）系统用来鉴定酿脓链球菌。首先从患者喉咙（用拭子取下）的化验标本中直接用酶法或化学方法提取表面抗原。采用如胶球凝集反应（latex bead agglutination）、酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunoassay，ELISA）或荧光抗体染色（fluorescent antibody staining）（见 24.8 节，24.9 节，24.10 节）的免疫学方法进行检测，而这些方法都用到酿脓链球菌表面特异蛋白质的抗体。直接从患者喉咙用药棉取到标本，几分钟内就可以处理和分析完毕。快速的诊断使得大夫可以立即开始适合的抗生素治疗以避免风湿热之类的并发症出现。

更为准确的诊断链球菌感染的方法是将从患者喉咙取到的样品在羊血琼脂（sheep blood agar）上进行酿脓链球菌培养（图 21.18）。RAD 检测的专一性（specific）与培养法近似，不过灵敏性（sensitive）却要差将近 40%，导致假阴性报告（见 24.7 节）。培养法需要 2 天，因此 RAD 检测更为普及。最灵敏的鉴定链球菌近期感染（recent infection）的方法是血清学检测——检查患者是否存在针对多种链球菌抗原的抗体，或该抗体效价（titer）是否增高（见 24.7 节）。新抗体的产生或已有抗体量的增多都可以确诊最近的链球菌感染。

肺炎链球菌

另一种主要的致病性链球菌是肺炎链球菌，所引起的肺感染通常是其他呼吸系统紊乱的继发性感染（secondary infection）。有荚膜的肺炎链球菌菌株由于潜在的侵袭力而致病性尤其强。细胞感染肺泡组织（下呼吸道），同时荚膜可以使细胞抵抗噬菌作用，引起宿主强烈的炎症反应。募集的噬菌细胞和体液通过积累会造成肺功能下降［肺炎（pneumonia）］。肺炎链球菌细胞［像菌血症（bacteremia）一样］会从感染部位传播，有时会引起骨骼、内耳的感染和心内膜炎（endocarditis）。肺炎球菌性肺炎（pneumococcal pneumonia）是一种很严重的感染，如果不加以治疗，死亡率约 30%，即便采用了积极的抗生素治疗，肺炎球菌性肺炎就医个体的死亡率也接近 10%。

肺炎链球菌的实验室诊断包括从患者痰或血液中培养革兰氏阳性双球菌。肺炎链球菌有超过 90 种不同的血清型［抗原性荚膜变异体（antigenic capsule variant）］，并且，同酿脓链球菌一样，感染所诱导的免疫防御只对正在侵染的肺炎链球菌的血清型有效。

预防和治疗

有效的多价疫苗可以预防 90 种已知肺炎链球菌中至少 2/3 菌株（包括所有常见的致病株）所造成的感染。疫苗由大多数常见致病株的荚膜多糖（capsular polysaccharide）混合物组成，用于上年纪的人、健康护理人员、缺乏免疫力的个体及其他呼吸感染高危人群（见 22.13 节）。

青霉素及其半合成的衍生物（见 20.8 节和 30.6 节）是用于治疗酿脓链球菌感染的代表药物，红霉素（erythromycin）和其他抗生素则用于获得性青霉素过敏症患者。

多数肺炎链球菌菌株对青霉素治疗的响应良好，然而也有青霉素抗性株存在，尤其是在那些引起医院获得性感染（hospital-acquired infection）的菌株中（见 25.7 节）。这样，必须要对从患者身上分离的菌株进行青霉素敏感性检测（见 24.3 节）。对青霉素抗性株可以使用红霉素，也可以用头孢菌素（cephalosporin）、氟喹诺酮（fluoroquinolone）、头孢三嗪（ceftriaxone）、头孢噻肟（cefotaxime）或万古霉素（vancomycin）（见 20.6～20.9 节）。不过，有些菌株获得了对上述每种药物的抗性，有些菌株具多重药物抗性，因此需要逐一检测每个分离株。

概念检查

由链球菌引起的疾病包括链球菌咽喉炎和肺炎球菌性肺炎。有时，酿脓链球菌感染会从咽炎发展成更严重的情况，如猩红热和风湿热。肺炎链球菌引起的肺炎是一种高致死率的严重疾病。通过培养对这两种病原菌进行确诊。两种病原菌的感染都可用抗生素治疗，但是已发现药物抗性株，尤其是肺炎链球菌。

◆ 酿脓链球菌感染怎样造成风湿热？

◆ 肺炎链球菌主要的致病因子是什么？

26.3 棒杆菌属和白喉

白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）引起的白喉（diphtheria），是一种严重的呼吸系统疾病，通常感染儿童。白喉可以预防和治愈，白喉棒杆菌是一种革兰氏阳性不运动的好氧菌，在生长过程中以聚集的棒状细胞形式出现，形成不规则的杆状（图26.6a）（见12.22节）。

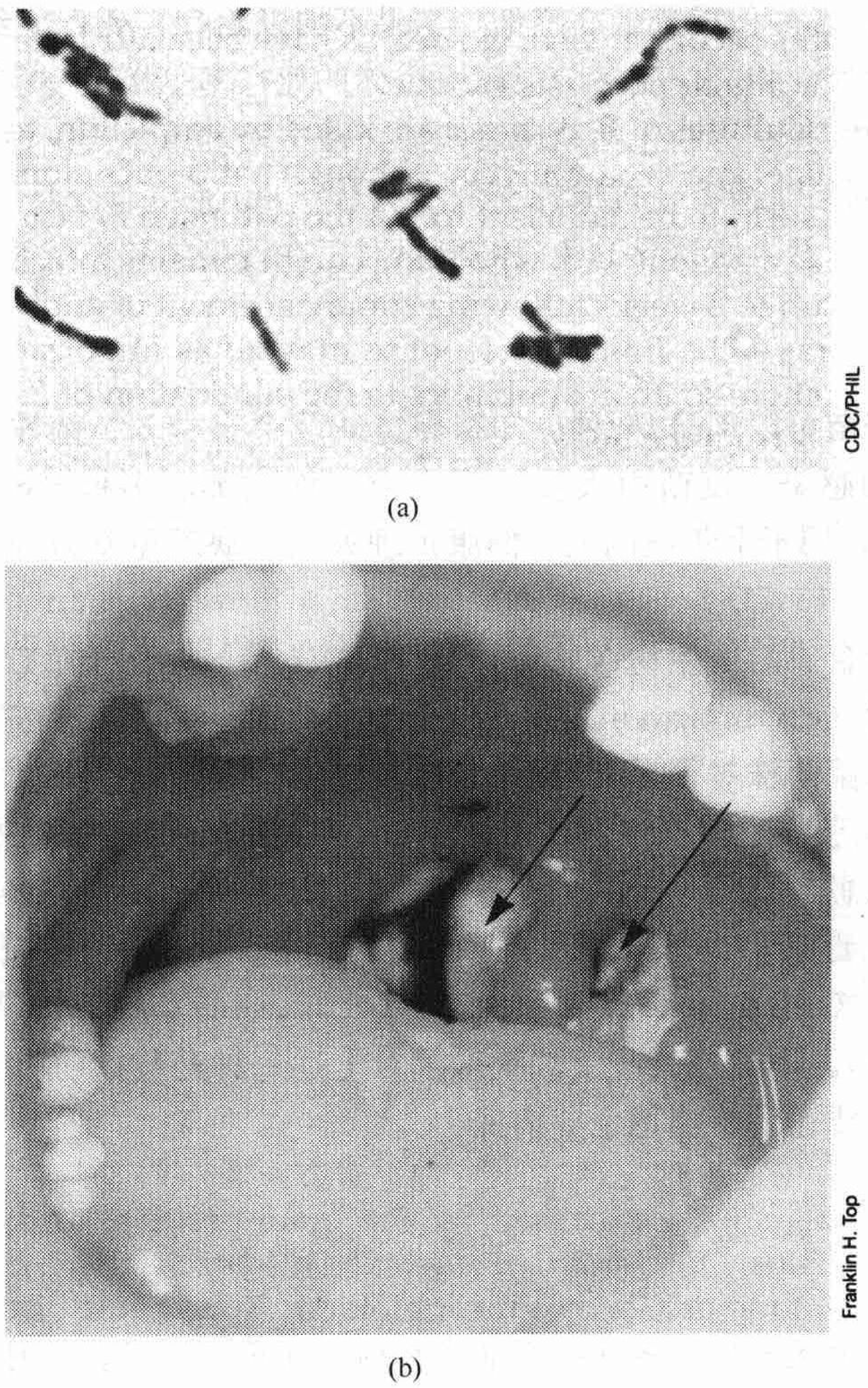


图26.6 白喉。（a）白喉棒杆菌细胞典型的棒状外形。细胞直径0.5～1μm，长度可能有几微米。（b）由白喉棒杆菌引起的白喉病例中的假膜（箭头）。

流行病学和病理学

白喉棒杆菌主要通过呼吸道进入机体，然后定居在喉和扁桃体。感染一般通过空气中的液滴从健康的携带者或患者传播给易感个体，之前的感染或免疫接种（见下）可以提供抗性以抵抗强效外毒素的作用。虽然对白喉棒杆菌黏附在这些组织上的机制研究有

限，但我们知道它可以产生神经氨酸苷酶，切割 *N*-乙酰神经氨酸（动物细胞表面糖蛋白一种组分），增强侵袭进程。喉组织对白喉棒杆菌感染的炎症反应主要是形成特征性的损伤，称为假膜（pseudomembrane，图 26.6b），是由损伤的宿主细胞和白喉棒杆菌组成的。在 10.9 节中，我们曾讲到，白喉棒杆菌的某些菌株可以被 β 噬菌体溶解，由于这些白喉棒杆菌能产生一种强有力的外毒素称为白喉毒素，因而被溶解的产毒素株拥有致病性。白喉毒素可抑制真核生物蛋白质的合成，从而杀死细胞（见 21.10 节）。

由于吸收毒素造成的死亡组织会在患者喉中形成假膜，假膜可阻断空气的进入，死于白喉的患者通常是由于局部窒息和外毒素引起的组织损伤造成的综合影响。在未经治疗的感染中，毒素会引起心脏［大约 25%的白喉患者发展为心肌炎（myocarditis）］、肾脏、肝脏和肾上腺（adrenal gland）系统性的损伤。

目前，虽然白喉曾经是一种主要的儿童疾病，但由于有一种有效的疫苗，因此现在白喉很少发生。在发达国家比如美国，这种疾病实际上几乎没有。世界范围内，每年仍有超过 5 万个病例，这主要是由于缺乏有效的免疫接种程序。例如，在阿富汗缺乏免疫接种的难民营中，近年来发生了白喉暴发。

诊断、预防和治疗

通过从患者喉部分离出白喉棒杆菌来确诊白喉。用鼻和喉拭子接种血液琼脂，亚碲酸盐培养基和抑制大多数其他呼吸道病原体生长的莱夫勒选择培养基（selective Loeffler's medium）。

已经有预防白喉的有效疫苗，这种疫苗是通过福尔马林处理白喉毒素而获得具有免疫原性的类毒素制剂（immunogenic toxoid preparation）。白喉类毒素是白百破（DTaP）［（diphtheria）、破伤风（tetanus）、非细胞性百日咳（acellular pertussis）］疫苗的一种成分。

对白喉患者可以同时用抗生素和白喉抗毒素［一种在其他动物体内形成的含有中和抗体（neutralizing antibody）的抗毒素（antitoxin）］进行治疗（见 24.7 节和 22.13 节）。青霉素、红霉素和庆大霉素通常可以有效抑制白喉棒杆菌的生长和更多毒素的生成，但是无法消除旧有毒素的影响，因此早期同时使用抗生素和白喉抗毒素对疾病的治愈十分必要。

概念检查

白喉是由革兰氏阳性菌白喉棒杆菌引起的急性呼吸道疾病。早期儿童免疫（DTP）对于预防这一严重的呼吸道疾病非常有效。

- 白喉的发病原因是感染吗？
- 怎样预防白喉的传播？

26.4 博德特氏菌属和百日咳

百日咳（whooping cough）是由感染百日咳博德特氏菌，也称百日咳杆菌（*Bor-*

detella pertussis）引起的非常严重的儿童呼吸道疾病。百日咳杆菌是一种微小的、革兰氏阴性需氧球杆菌，1906 年 Bordet 和 Gengou 发现它与百日咳有关。

流行病学和病理学

百日咳是一种急性、高感的呼吸道疾病，常见于 5 岁以下儿童。百日咳杆菌通过分泌一种特殊的黏附分子——丝状凝集抗原（filamentous hemagglutinin antigen），黏附到上呼吸道的细胞上，这些抗原可以识别宿主细胞表面互补的分子。一旦黏附，百日咳杆菌开始生长并产生百日咳外毒素诱导环式腺苷单磷酸（cAMP）的合成（见 8.7 节），这至少部分地导致宿主组织损伤的发生。百日咳杆菌也产生内毒素，它同样会诱导一些百日咳症状的产生。临床上，百日咳表现为反复剧烈的咳嗽，并可能持续 6 个星期。以上这种病名的由来正是由于痉挛性的咳嗽，这种咳嗽声是患者为获得充足的空气深呼吸产生的。世界范围内，每年百日咳病例有 5 千万，其中 35 万死亡。

近年来，美国百日咳的发病率呈明显上升趋势，20 世纪 80 年代开始，百日咳杆菌的感染和发病呈持续上升趋势，扭转了自从有效疫苗接种以来一直的下降趋势。1976 年是百日咳流行与发病最少的一年，仅有 1010 个报道病例，而 2003 年，达到 8489 例。每年有将近 60%或超过 4000 个病例是 5 岁以上的患者，包括许多免疫能力不健全的青少年和成人；大约 24%的病例是未接受全部推荐剂量的百日咳疫苗接种的 6 个月以下的儿童。根据对美国有些城市近来零星的暴发和阿富汗难民营的流行性暴发进行的统计，百日咳这一强传染性疾病的威胁还是很高的。将近 32%的持续一两周或更长时间的咳嗽是由百日咳杆菌引起。研究表明，世界范围内，除了针对儿童的免疫程序，对青少年和成人的免疫也应该是优先的，以此来建立群体性免疫（见 25.4 节），阻止这种地区性呼吸道病原菌的感染。

诊断、预防和治疗

百日咳可通过鼻咽部拭子样本的荧光抗体染色或直接培养菌体法来诊断。将鼻咽部吸出物直接在血-甘油-马铃薯提取物（虽然没有选择性，但这种介质有助于百日咳杆菌的恢复）琼脂平板上接种最适宜百日咳杆菌恢复。含有小的革兰氏阴性球杆菌的 β-溶血菌落也可用于检测百日咳杆菌，主要是用胶球凝集反应实验或荧光标记的抗百日咳杆菌的抗体鉴定（见 24.8 节和 24.9 节）。如果条件允许，聚合酶链反应（PCR）是最灵敏和优先选择的诊断方法（见 24.12 节）。诊断和报告技术的进步也许是近来美国百日咳病例增加的原因之一。

由源自百日咳杆菌的蛋白质所组成的疫苗是常规 DTaP 疫苗的一部分。对刚出生的儿童就应该开始适当间隔的数次接种，只有这样才能有效（见 22.13 节）。在美国，将近 50%患百日咳的儿童都未很好地免疫，并且目前的免疫制剂只有 60%～90%有效。

百日咳疫苗具副作用，包括局部肿大、发红和发烧，其发生比例高达 1/4。有时会引起更严重的问题，例如，痉挛（1/14 000）、无法控制的哭闹（1/1000）或很严重的高烧（1/16 000）。总的来讲，百日咳的感染风险和严重后果要远超过免疫过程的危害。目前，美国每年因百日咳死亡 8 例，接种非细胞性百日咳疫苗尚无致死报道。

百日咳杆菌可以被氨苄青霉素、四环素和红霉素杀死，不过在体内，单独一种抗生

素不见得能杀死病原体。一个患有百日咳的患者在开始抗生素治疗两周后，还具有传染性，因此在清除机体内百日咳杆菌方面，免疫应答与抗生素治疗同等重要或更重要。

概念检查

在美国，每年百日咳病例数目在增加，从 20 世纪 70 年代的平均不到 2000 上升到现在的超过 8000。儿童免疫的不足使他们患百日咳的危险性很高。

◆ 使用什么方法可以降低人群中百日咳的发病率？

◆ 指出使用百日咳疫苗的潜在问题。

26.5 分枝杆菌、结核病与麻风病

结核病（tuberculosis）是由革兰氏阳性抗酸杆菌——结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）引起的（见 12.23 节）。1882 年德国著名微生物学家 Robert Koch 分离并描述了结核病的病原体——结核分枝杆菌（见 1.6 节）。分枝杆菌的抗酸特性是由细胞壁含有的蜡样分枝酸组分所造成。分枝酸使这个种的所有成员具有相同特点，甚至用含有 3%盐酸的乙醇冲洗后都能保留苯酚品红的染色（图 26.7）。

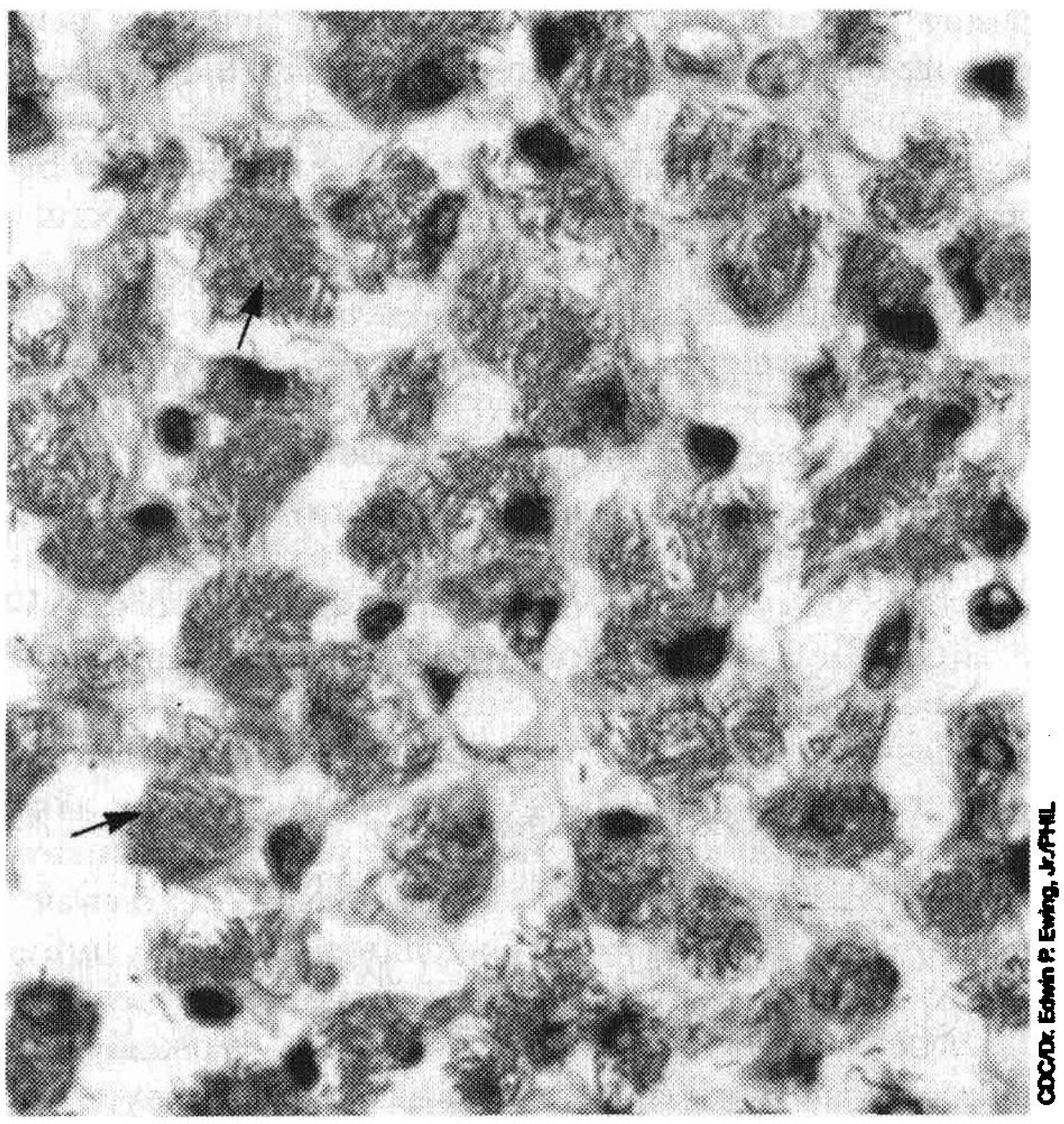


图 26.7　AIDS 患者淋巴结活检中抗酸染色的鸟分枝杆菌（*Mycobacterium avium*）。每个细胞中有非常明显的多个杆菌，杆体被苯酚品红染成红色（箭头），大约 0.4μm 直径和将近 4μm 长。

流行病学

结核分枝杆菌通过呼吸途径传播，甚至简单的交谈都能够造成人之间的传染。曾有段时间，结核病是世界上最主要的人类传染性疾病，世界上有 1/7 的人死于结核。目前，美国每年有超过 11 000 的新病例，死亡约 750 人。全世界范围内，结核病每年造成 1600 万人死亡，占传染性疾病死亡人数的大约 11%，将近 1/3 的人口都感染过结核病（表 25.1）。近年来，美国许多新的结核病病例发生于获得性免疫缺陷综合征（AIDS）患者身上。

病理学

感染取决于菌株的致病力和宿主的抵抗力，人类宿主和结核分枝杆菌的相互作用非常复杂。细胞介导的免疫在感染后疾病发作的预防上起着十分重要的作用。结核病分为初次感染（primary infection）又称为起始感染（initial infection）和后初次感染（postprimary infection）又称为再次感染（reinfection）。初次感染是由于机体吸入了带有来自活跃肺部感染患者的病菌的气雾或尘粒，细菌在肺部居留并生长所致。宿主对结核分枝杆菌产生免疫应答，导致迟发型超敏反应（见 22.15 节），形成活化的巨噬细胞聚集，称为结核结（tubercle，图 1.13）。即便是处于免疫应答之中，细菌通常能够在巨噬细胞内存活并生长。在抵抗力低的个体中，由于细菌不能有效地得以控制，因此就会发生急性的肺部感染，导致肺部组织的严重损伤及细菌向机体其他部位扩散，甚至引起死亡。这种情况下，结核分枝杆菌能够在低 pH 和噬菌细胞如巨噬细胞的溶酶体产生的抗菌氧化物的作用下存活（见 22.2 节）。

在大多数结核病病例中，急性感染很少发生，感染常是局部的和不明显的，然后消退。但是这种起始感染使机体对细菌及其产物更加敏感，结果改变了机体对其后接触结核分枝杆菌时的反应。一种称为结核菌素检测（tuberculin test）的试验可检测这种超敏性。当结核菌素（一种结核分枝杆菌提取蛋白质）皮下注射过敏个体时，1～3 天内在注射部位就会引起免疫反应。这种反应的特征是形成硬结（induration）和肿块（edema）（图 22.26）。表现出这种反应的个体称为结核菌素阳性（tuberculin-positive）。许多健康成人都表现阳性，因为以前有过不明显的感染。结核菌素阳性并不表明患有结核病，只说明该个体在某个时候曾接触过结核分枝杆菌并产生了细胞介导的免疫应答。

对于多数的个体，这种免疫终身具有保护作用。然而，一些结核菌素试验阳性患者发生了后初次结核感染，有的是从外界再次感染了病菌，有的是肺巨噬细胞中存活并休眠（通常几年）的结核分枝杆菌的再次活动而造成。由于实质上存在潜在的结核病菌感染，结核菌素试验阳性个体通常要接受抗生素治疗（见下）。许多因素，诸如年龄、营养不良、过分拥挤、压力和激素失调都有可能减弱未完全治愈患者的免疫效果，使得休眠的感染再次发生。

继发性肺感染通常发展为慢性感染，导致肺部组织的损伤，随后部分康复，感染点钙化（calcification）。这样，慢性后初次结核感染通常造成肺部渐进扩散的结核损伤。活跃发病的患者痰中可以发现病菌，X 射线检查可以看到组织损伤的区域（图 26.8）。

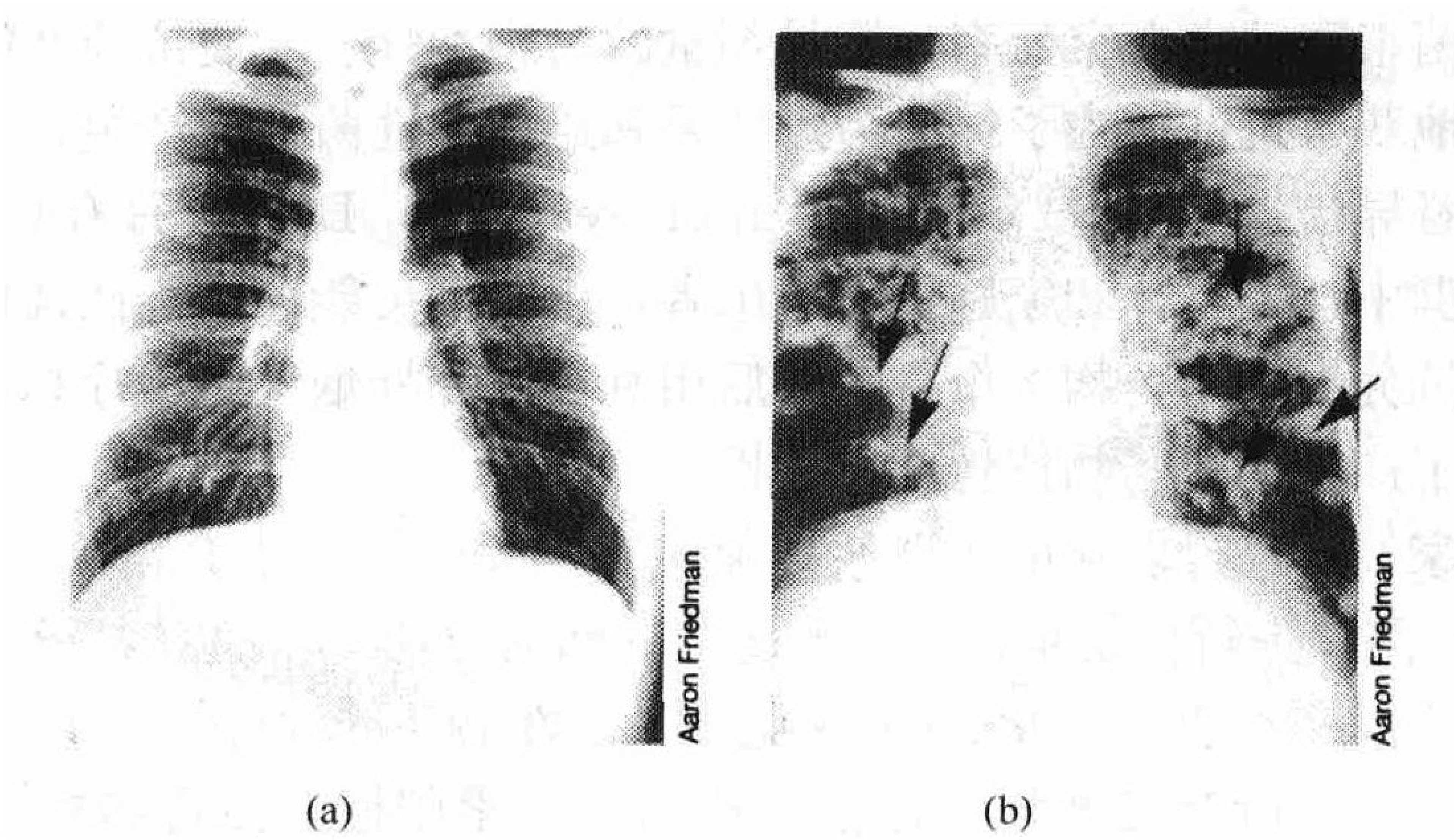
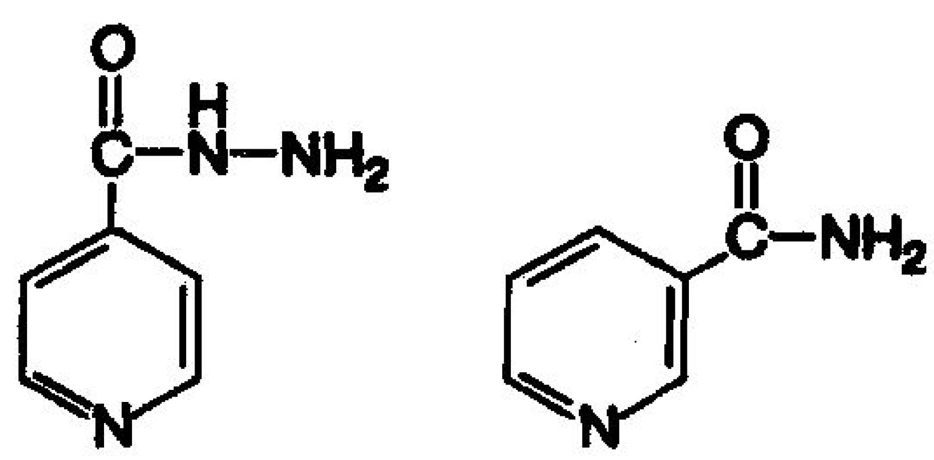


图 26.8　结核病与 X 光诊断。(a) 正常胸腔的 X 光照片。不明显的白线是动脉和其他血管，心脏是可见的，为右下 1/4 处一个白色膨胀物。(b) 一个患晚期肺结核的患者；白斑（箭头）指的是疾病区，这些斑或结核结含有活的结核分枝杆菌。在这些损伤处，肺的组织和功能被永久性地损害了。

预防和治疗

结核病患者只要咳嗽或近距离说话就可以把疾病传给没有感染的个体。由于结核病是极易接触性传染的，所以美国职业安全与健康管理委员会严格要求保护那些照顾结核患者的医务工作者。例如，结核病患者的医治必须在负压房间内；另外，接触患者的护理人员必须戴含高效空气过滤膜（HEPA）的合适的面罩。这种过滤膜可防止痰或尘粒中结核分枝杆菌的传播。

化疗是控制结核病的一种主要方法，化疗的首次成功是链霉素的使用，但治疗结核的真正疗效是异烟酰肼（isonicotinic acid hydrazide，isoniazid 或 INH）的发现（图 26.9）。这种药物专门对付分枝杆菌，不仅有效，而且价格低廉，口服吸收效果良好。虽然异烟酰肼的作用模式并不完全清楚，但它影响分枝杆菌分枝酸的合成（分枝酸是一种脂类，与分枝杆菌细胞壁的肽聚糖结合形成复合物）（见 12.23 节）。异烟酰肼会模仿一种结构相关分子——尼克酰胺（图 26.9），掺入到尼克酰胺的位置，使需要这种化合物的酶失活。



异烟酰肼　　尼克酰胺

图 26.9　异烟酰肼的结构。异烟酰肼是结核病的有效化疗制剂，其结构类似于尼克酰胺。

治疗分枝杆菌时用极少量的异烟酰肼（5pmol/10^9 个细胞）就可抑制分枝酸的合成，继续使用会造成细胞外膜区的破坏，细胞丧失完整性并死亡。异烟酰肼治疗后分枝杆菌会失去抗酸染色特性，因为抗酸反应主要是分枝酸在染色中起作用（见 12.23 节）。然而，分枝杆菌对异烟酰肼和其他药物的抗性却是以惊人的速度不断增加，特别是在那些艾滋病患者中（见 26.14 节）。

结核病典型的治疗是每日服用异烟酰肼和利福平两个月，随后改为每两周用药一次并坚持 9 个月，如此才能彻底铲除结核杆菌，避免抗药菌株的产生。如果不能完成规定的治疗，就会引起感染的恢复，而且这些恢复的菌株常对以前的治疗药物产生抗性。由

于结核分枝杆菌很高的自发突变率，不足剂量的药物治疗会促使抗药性的产生，对单一抗生素会很快地获得抗性。为了保证治疗效果和避免抗性菌株的产生，对不服从治疗的患者采取直接督导治疗（direct observation of treatment，DOT）是有必要的。

在某些人群中，如住院和家庭护理的患者，由于极可能存在抗性菌株，常规治疗就使用将近 4 种抗分枝杆菌药物 2 个月，随后用利福平和异烟酰肼治疗总共 6 个月。多重药物治疗降低了产生多重药物抗性的可能性。

在许多国家，用经过弱化的牛分枝杆菌（*M. bovis*）——卡介苗（bacillus Calmette-Guerin，BCG）菌株进行免疫是常规的预防结核病的方法。不过在结核病流行不严重的美国和其他一些国家，通常不提倡 BCG 免疫。活性 BCG 疫苗诱导产生迟发型超敏反应（见 22.15 节），并且所有接种的个体都变成结核菌素阳性，使得结核菌素试验丧失价值，不再能作为诊断的标准和结核分枝杆菌感染传播的流行病学指示。

麻风分枝杆菌和汉森氏症（麻风病）

麻风分枝杆菌（*Mycobacterium leprae*）由 G. A. Hansen 于 1873 年发现，引起汉森氏症（Hansen's disease）或麻风病（leprosy）。麻风分枝杆菌是不能在人工培养基上生长的唯一的分枝杆菌。犰狳是唯一一种能成功培养麻风分枝杆菌并产生类似疾病的实验动物。

最严重类型的麻风病在身体上出现折叠的泡状损伤，特别是在脸和手足（图 26.10），这主要是由于麻风分枝杆菌细胞在皮肤内生长的结果。损伤部位每克组织含有将近 10^9 个的细菌细胞。与其他分枝杆菌一样，损伤部位的麻风杆菌可以被抗酸染色法中的苯酚品红染成深红，这样就提供了一种快速权威的活性感染的鉴定方法（见 12. 23 节）。瘤型（lepromatous）麻风病患者的预后非常差，情况严重时，那些毁容的损伤会导致外周神经的破坏，使之失去运动神经的功能。许多麻风病患者明显的损伤较少，且损伤处也找不到麻风杆菌，这些人是结核型（tuberculoid）麻风病。结核型麻风病

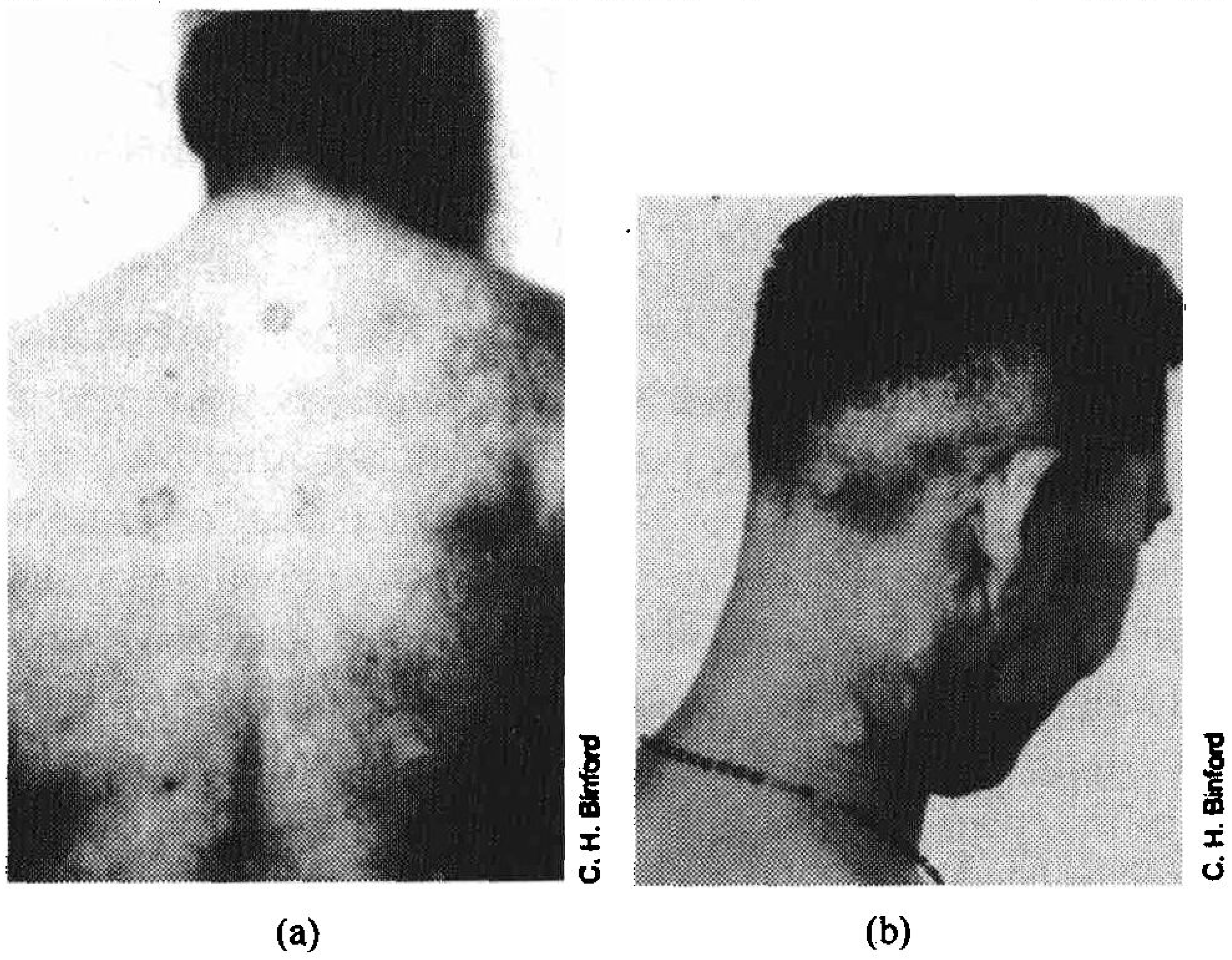


图 26.10 瘤型麻风病造成的皮肤损伤。瘤型麻风病由麻风分枝杆菌的感染造成。损伤部位每克组织含有将近 10^9 个的细菌细胞，是预后很差的不可控型感染。

(tuberculoid leprosy) 的特点是产生强劲的迟发型超敏反应（见 22.15 节）并且自发恢复预后良好。每种单一类型的麻风病或中间类型的麻风病都可以采用多重药物治疗（MDT）的治疗方案，包括 dapsone（4,4′-sulfonylbisbenzeneamine）、利福平和氨苯吩嗪（clofazimine）。与结核病一样，药物抗性菌株已经出现，尤其发生在只用单个药物治疗或剂量不足的治疗之后。用将近一年时间，采取 MDT 方案的扩展性药物治疗可以根治麻风感染。

麻风分枝杆菌的致病机制是迟发型超敏反应（见 22.15 节）和病菌侵袭的共同作用结果。麻风病通过直接接触传染和呼吸途径传染，潜伏期从几周到一年甚至数十年。这种病菌在巨噬细胞内生长，导致细胞内感染，以至于引起皮肤内出现大量的细菌群。

世界上很多地区的麻风病发病率很低。2002 年，全世界有 763 917 例新的麻风病例，但美国只有 96 例，90%的病例发生于马达加斯加、莫桑比克、坦桑尼亚和尼泊尔。将近 200 万人由于麻风而永久性伤残。由于该病慢性并且潜伏期长的特点，可能有 1200 万患者没有被发现和报告。

其他致病的分枝杆菌

作为一种普通的奶牛的病原体，牛分枝杆菌（*Mycobacterium bovis*）对人和动物都具有致病性。通常当人们饮用未加工的牛奶时，牛分枝杆菌可通过肠道进入人体，在肠道局部感染后，病菌开始向呼吸道传播，并引起典型的结核病症状。牛分枝杆菌与结核分枝杆菌是两种不同的生物，可是二者在 DNA 水平高度同源，虽然牛分枝杆菌有几个基因的缺失，但在感染性和人类发病机制上与结核分枝杆菌没有明显不同。在发达国家，饮用消毒的牛奶和清除病牛对于防止结核从牛到人的传播十分重要。

许多其他的分枝杆菌偶尔也是人类的致病菌，例如，堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*）、瘰疬分枝杆菌（*M. scrofulaceum*）、龟分枝杆菌（*M. chelonae*）和其他一些分枝杆菌（见 12.23 节）。对 AIDS 患者来说，与正常人不同，鸟分枝杆菌复症（*M. avium* complex，MAC）群所属的任一微生物，显然都会造成呼吸道疾病（图 26.7）（见 26.14 节）。

概念检查

结核病是世界上最流行和危险的疾病之一。在发达国家其发病率在上升，这种情况部分是由于药物抗性菌株的出现造成的。细胞免疫应答影响结核病和麻风病的病理学。

- ◆ 为什么结核分枝杆菌是一种广泛传播的呼吸道病原体？
- ◆ 分枝杆菌感染中哪些因素有助于药物抗性的产生？
- ◆ 鉴定其他的能引起人类疾病的分枝杆菌。

26.6 脑膜炎奈瑟氏球菌、脑膜炎和脑膜炎球菌血症

脑膜炎（meningitis）是脑膜或保护中枢神经系统（尤其是脊髓和脑）膜的炎症。病毒、细菌、真菌和原生动物感染都可以引起脑膜炎。这里我们所提到的是由脑膜炎奈

瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）引起的传染性细菌性脑膜炎和一种相关的感染——脑膜炎球菌血症（meningococcemia）。

脑膜炎奈瑟氏球菌通常称为脑膜炎球菌，是革兰氏阴性、不产芽孢、专性需氧、氧化酶阳性、有荚膜的双球菌（图 26.11），直径 0.6～1.0μm。按照荚膜多糖抗原性的不同，至少发现了 13 种脑膜炎奈瑟氏球菌不同的致病菌株。

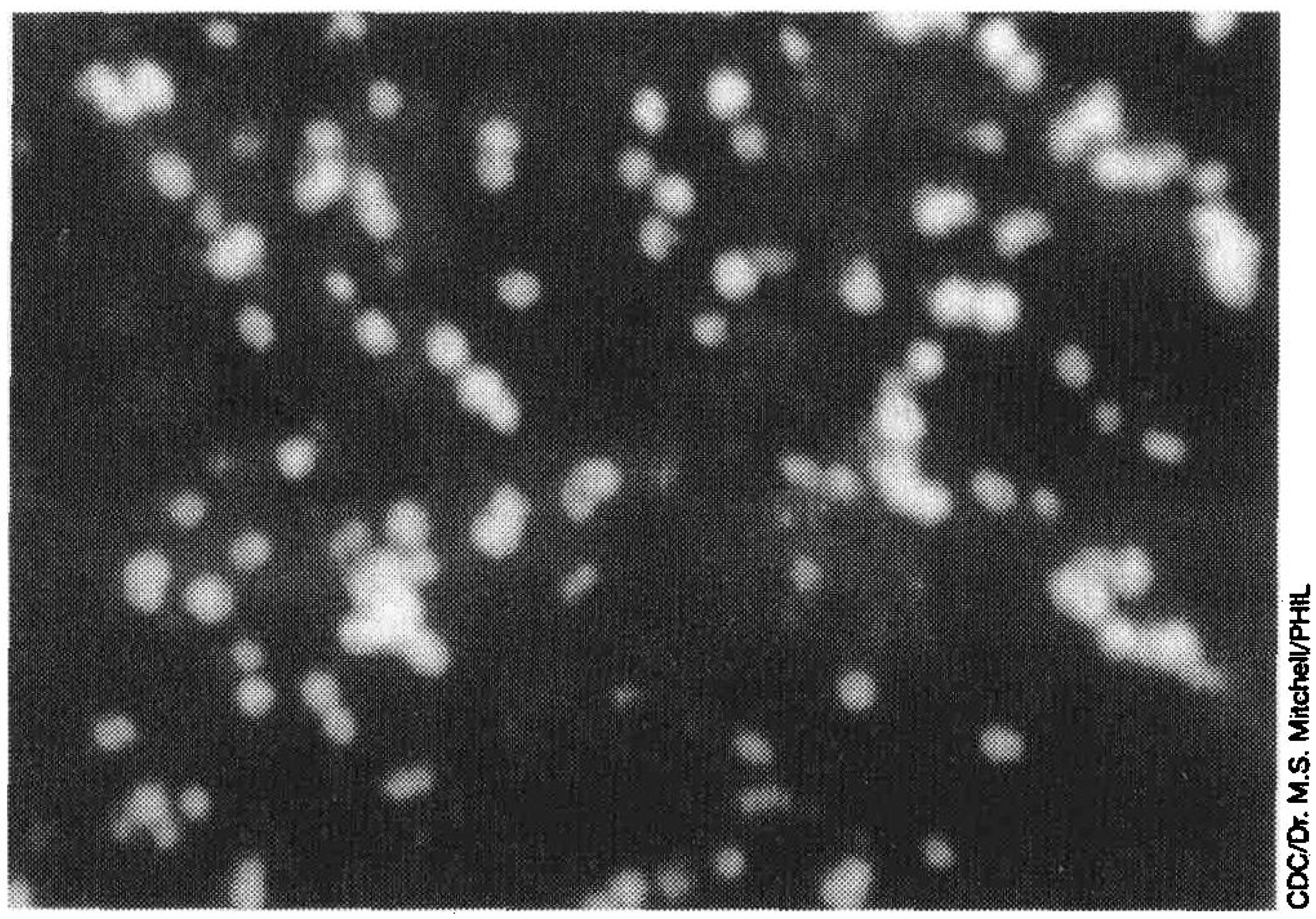


图 26.11 脑膜炎奈瑟氏球菌的荧光抗体染色。一个感染患者脑脊髓液中观察到的引起成人脑膜炎和脑膜炎球菌血症的微生物。单个的球菌直径 0.6～1.0μm。

流行病学和病理学

球菌性脑膜炎通常发生于封闭的人群中，如军事机构或大学校园。一般它影响学龄儿童和年轻人。将近 30%的人在鼻咽部正常地携带脑膜炎奈瑟氏球菌且没有明显的有害影响。在疾病流行阶段，携带者的比例可上升到 80%。从无症状的携带状态转换为病理性的急性感染的触发机制尚不了解。

在急性脑膜炎球菌感染中，细菌通常通过呼吸途径传播到宿主。细菌吸附到鼻咽部细胞上并进入血流，引起菌血症和简单的上呼吸道感染症状。菌血症有时导致暴发性的脑膜炎球菌血症，特征为败血病（septicemia）、血管内血凝固（intravascular coagulation）和休克，超过 10%的患者会死亡。脑膜炎是脑膜炎奈瑟氏球菌感染的另一种可能的严重后果，特征是突发性头疼、呕吐、脖颈僵直并可能在大约数小时内发展为昏迷和死亡。急性球菌性脑膜炎患者的死亡率接近 3%。

在美国，2002 年有 1814 例严重的脑膜炎球菌疾病，这是自 1977 年以来最低的数字。发病率的降低说明在易感人群中广泛的疫苗接种获得了成功，然而死亡率仍然有将近 12%。

诊断、预防和治疗

在修饰的 MTM（Thayer-Martin medium）培养基（见 24.1 节）上接种从鼻咽部拭子、血或脑脊髓液中分离的样本，这种选择性培养基能够抑制大部分普通细菌群落的生长，但是能够让脑膜炎奈瑟氏球菌和淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）生

长。氧化酶检测（见 24.3 节）阳性的革兰氏阴性双球菌菌落可以鉴定为奈瑟氏菌。然而，由于危及生命的症状发作得十分快速，初步的诊断通常只依据临床的症状，并且在确认奈瑟氏菌感染的培养试验之前治疗就应该开始。

青霉素 G 是治疗脑膜炎奈瑟氏球菌感染的可选药物，不过已经发现有抗性菌株。对青霉素过敏的患者可以用氯霉素替代治疗感染。许多广谱的头孢菌素（cephalosporin）也是有效的（见 20.8 节）。

对大多数成年人来说，亚临床感染自然菌株产生的特异性抗体对感染的预防是有效的。不幸的是，没有可靠的长效疫苗以预防脑膜炎和脑膜炎球菌血症。不过，当疾病流行时，从一些最流行致病菌株中纯化的多糖疫苗是有效的，可以用于免疫亲密接触的人群。疫苗也用于住在宿舍的军人或学生这类的易感人群。另外，利福平通常也作为一种化学预防的抗生素，用于亲密接触的人群和感染患者家庭成员的疾病预防。

脑膜炎的其他致病原因

许多其他的微生物也会引起脑膜炎。急性脑膜炎通常由一种化脓性细菌引起，例如，金黄色葡萄球菌、链球菌或流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）。流感嗜血杆菌主要感染儿童，已经有预防流感嗜血杆菌性脑膜炎的有效疫苗。在美国，学龄儿童都被要求接种（见 22.13 节）。

几种病毒也引起脑膜炎，包括单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（lymphocytic choriomeningitis virus，LCM）、腮腺炎病毒（mumps virus）和肠道病毒（enterovirus）。通常，病毒性脑膜炎没有细菌性脑膜炎严重。

概念检查

脑膜炎奈瑟氏球菌是脑膜炎球菌血症和脑膜炎的常见病因，这两种病症在年轻成人身上发作，偶尔流行于封闭的人群。细菌性脑膜炎球菌血症和脑膜炎是有很高致死率的严重疾病。恰当的治疗和预防策略可以防止流行性暴发，但是尚未开发出有效的通用疫苗。

- 描述脑膜炎奈瑟氏球菌感染和脑膜炎球菌血症的发生。
- 可以预防脑膜炎球菌血症吗？请解释。

26.7 病毒和呼吸道感染

如前所述（见 20.10 节），由于病毒的生长与宿主细胞的功能密切相关，决定了它们不像细菌或其他微生物那样容易被化疗的方法控制。大多数特定攻击病毒的化学药物至少同时造成一些对宿主细胞的损害。因此毫不奇怪当今最流行的传染病就是病毒引起的，尤其是在发达国家。许多病毒性疾病只是急性的、自限性的感染，而有些会对正常健康成人产生影响。另外，像天花（smallpox）、狂犬病（rabies）等较严重的病毒性疾病都可以用免疫法有效的加以控制。我们先开始介绍麻疹（measles）、流行性腮腺炎

(mumps)、病毒性风疹（rubella）和水痘（chickenpox），这些疾病都是在有感染性的雾滴中通过空气传播的。

麻疹

麻疹（measles 又称 rubeola 或七日麻疹）是一种急性高感染的儿童疾病。其特征是鼻塞、眼红、咳嗽和发烧。麻疹病毒是一种副黏病毒（paramyxovirus）（见 16.9 节）借空气传播，从人的鼻和喉部进入机体，很快造成系统性的病毒血症。随着病情的进一步发展，出现发烧和咳嗽症状并不断加剧，并且开始出现皮疹（图 26.12）。多数情况下，麻疹的症状持续 7～10 天。感染后 5 天可以检测到抗麻疹病毒的抗体，血清中的抗体与细胞毒性 T 淋巴细胞（见 22.9 节和 22.7 节）共同作用来清除系统中的病毒。患麻疹后还会出现各种并发症，如内耳感染、肺炎，极少情况下还会出现麻疹性脑脊髓炎。脑脊髓炎会造成神经系统紊乱、癫痫，死亡率近 20%。

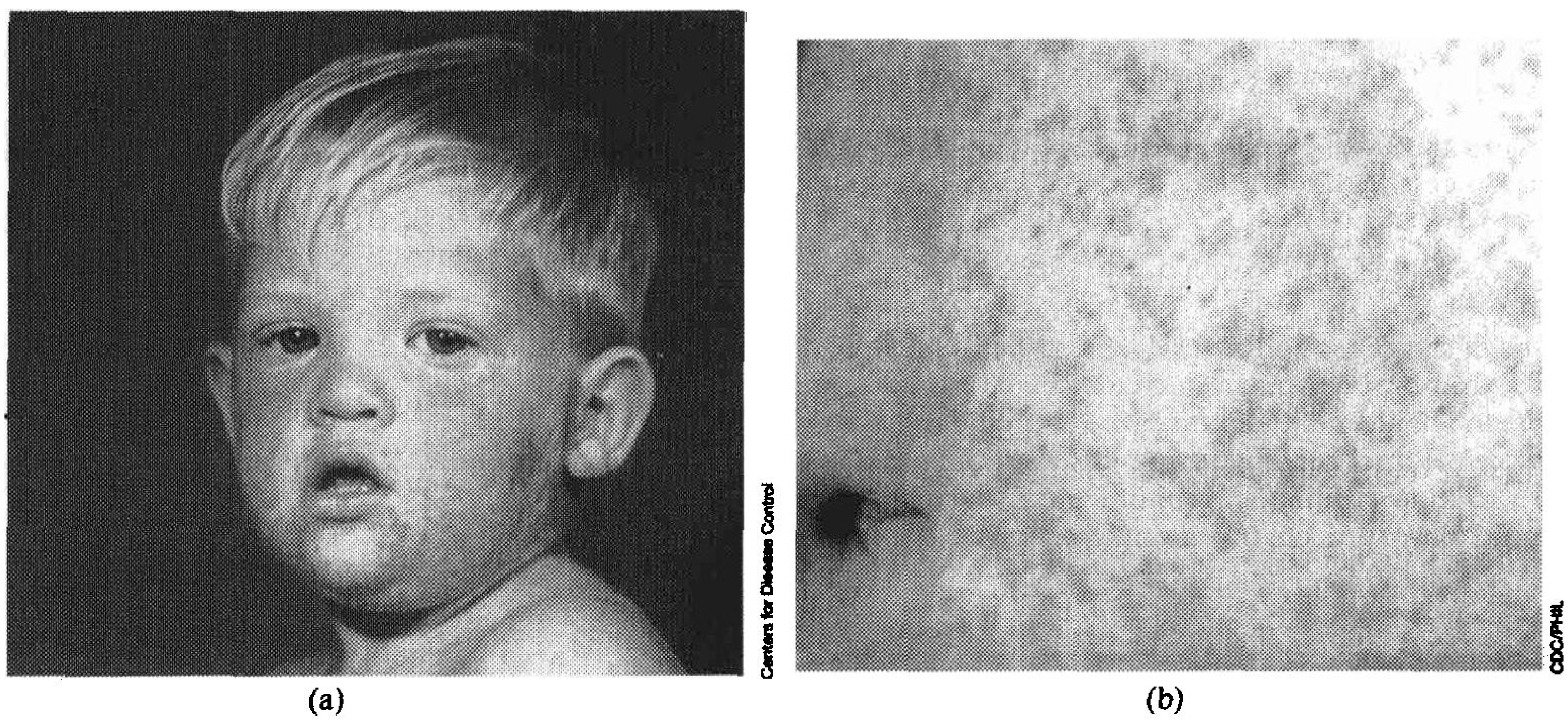


图 26.12 儿童所患麻疹。(a) 头颈部开始出现粉红色皮疹。(b) 扩散到胸、躯干和四肢。当皮疹发展几天之后，离散的丘疹合并成大斑。

虽然麻疹是种常见儿童病，但由于 20 世纪 60 年代中期开始的全球性疫苗计划，使得该病目前很少暴发（图 26.13a）。由于麻疹极易感染，在美国许多学校要求学生在入学时接种麻疹疫苗。免疫使用 MMR（麻疹、流行性腮腺炎、病毒性风疹）疫苗（见 22.13 节）。儿童时期患过麻疹通常终身都具有免疫力。

流行性腮腺炎

流行性腮腺炎（mumps）同麻疹一样，是由副黏病毒引起的，也具有高传染性。流行性腮腺炎通过空气中的液滴传播，主要病征是唾腺发炎导致颌、颈肿胀（图 26.14）。这种病毒通过血液传播可感染其他器官，包括脑、睾丸和胰腺。严重的并发症包括脑炎（encephalitis）和罕见的不育（sterility）。宿主的免疫系统可以产生抗腮腺炎病毒表面蛋白质的抗体，这样很快就可痊愈。一种减毒的腮腺炎疫苗可有效地防止这种疾病（图 26.13b）。因此，像麻疹一样，近三十年流行性腮腺炎在发达国家的发病率也在明显下降，只有那些在儿时未接种过 MMR 疫苗的个体会感染流行性腮腺炎。

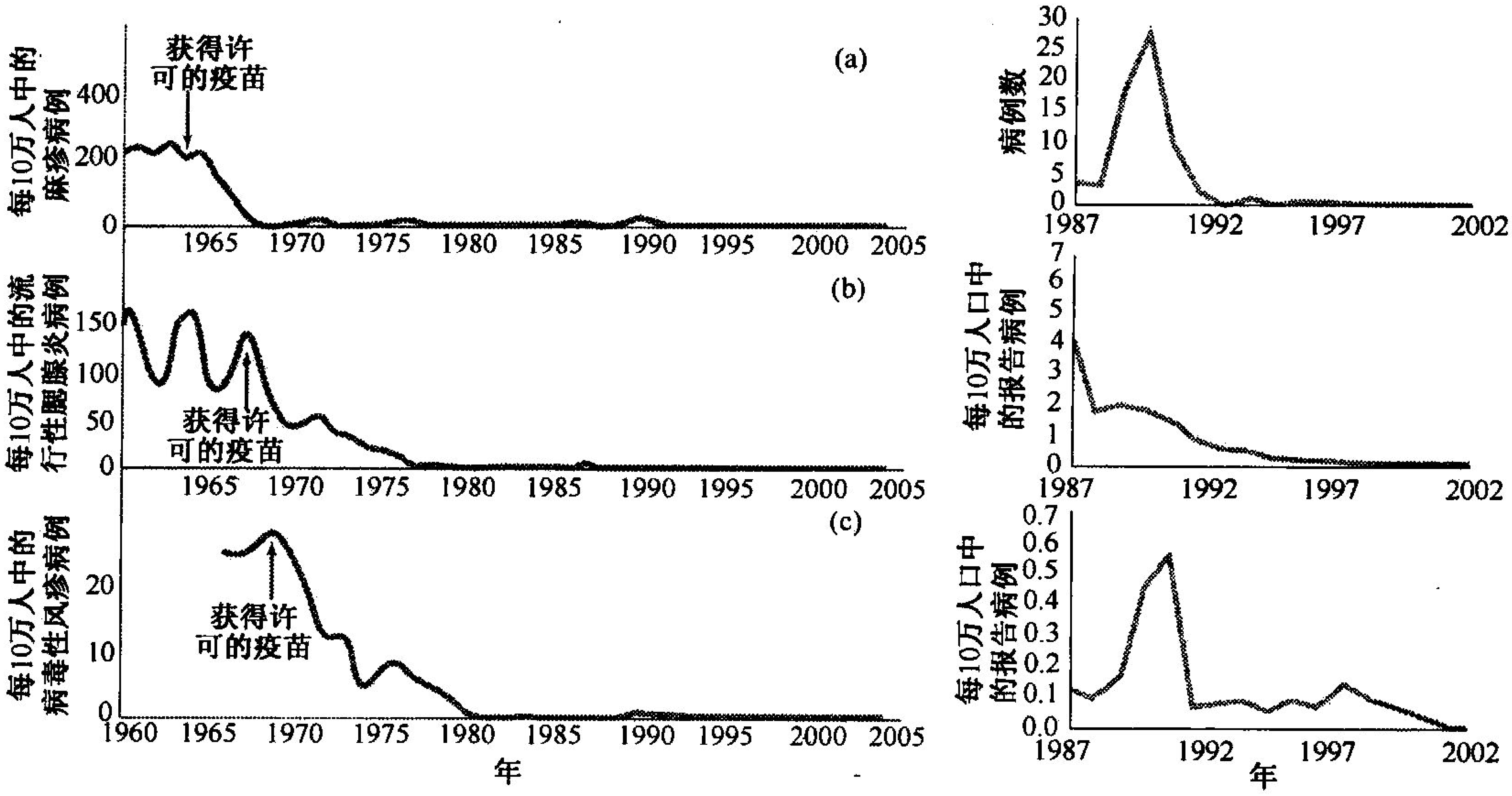


图 26.13　病毒性疾病和疫苗。现在 MMR（麻疹、流行性腮腺炎和病毒性风疹）疫苗控制美国主要的儿童病毒性疾病（a）麻疹。（b）流行性腮腺炎。（c）病毒性风疹。该插图显示了这些疾病更近期的情况。数据从美国佐治亚州亚特兰大疾病控制与预防中心获得。

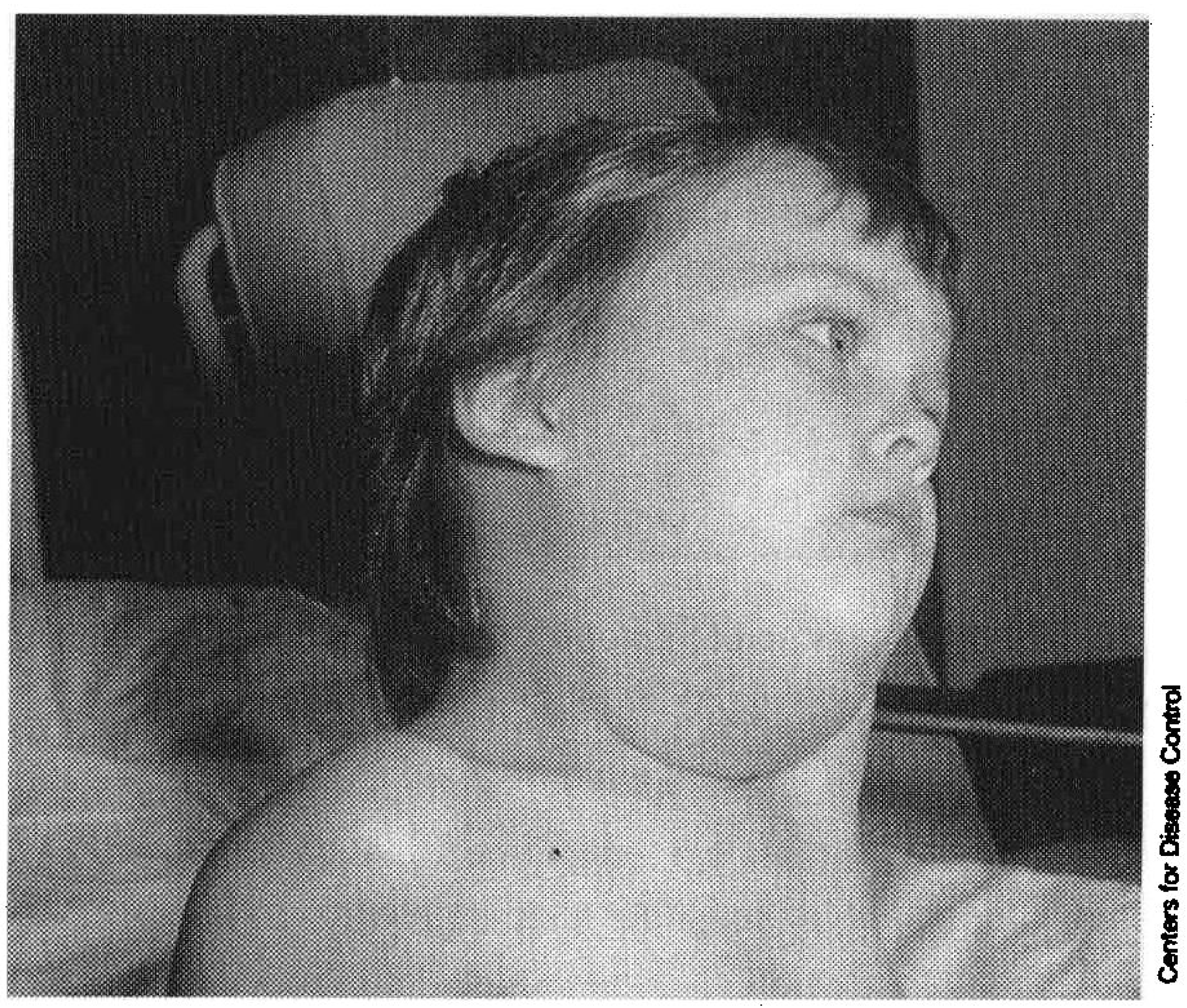


图 26.14　流行性腮腺炎。流行性腮腺炎病毒引起的特征性腺体肿大。

病毒性风疹

病毒性风疹（rubella）（德国麻疹或三日麻疹）是由囊膜病毒（togavirus）中一种单链正义 RNA 病毒引起的（见 16.8 节）。

它的症状类似麻疹，但通常较温和一些。病毒性风疹不像麻疹那样容易传染，所以有很大一部分人群都从未感染过。但是，在怀孕的前三个月，风疹病毒可通过胎盘传播给胎儿，造成严重的胎儿畸形。风疹会造成婴儿出生时死亡、耳聋、心脏和眼睛缺陷及

大脑的损伤。因此，妇女在怀孕的前三个月不应当接种风疹疫苗或接触风疹患者。正因为以上原因，一定要为儿童进行常规的病毒性风疹的免疫。弱化的风疹病毒是MMR疫苗（见22.13节和图26.13c）的一部分。

水痘和带状疱疹

水痘（chickenpox又称varicella）是由一种疱疹病毒（herpesvirus）——Varicella-zoster virus（VZV）引起的常见儿童疾病（见16.12节）。VZV是高度传染的，它通过具有传染性的液滴传播，特别是当易感个体亲密接触时。在学生中，例如，冬季那几个月，由于接触较紧密，水痘可以通过吸入已感染同学在空气中产生的液滴或接触污染物而传播。病毒进入呼吸道开始增殖，通过血流快速地散布，造成全身性的皮疹，但很快皮疹就会痊愈，并很少留下斑痕（图26.15）。在美国，现在推荐使用一种弱化病毒疫苗（见22.13节）。目前，每年报告的水痘发病率大约是刚开始进行大范围免疫1994年的1/3。

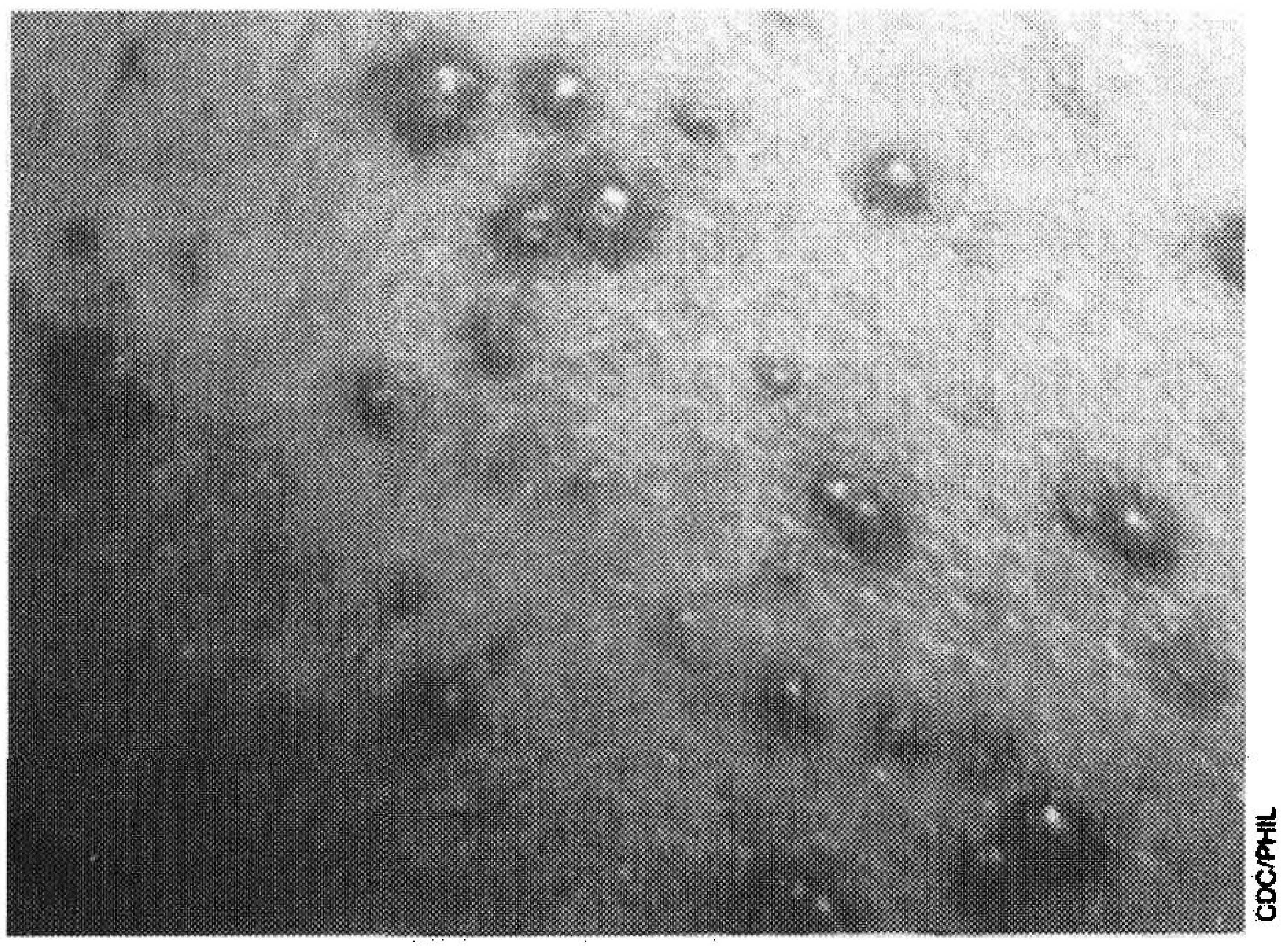


图26.15 水痘。Varicella-zoster病毒（VZV）感染引起的突起状轻度皮疹，VZV是引起水痘的一种疱疹病毒。

VZV病毒能在神经细胞中休眠数年，不引起明显的症状。有时，病毒会从储存宿主中迁移到皮肤表面，造成疼痛的皮疹，称为带状疱疹（shingles又称zoster）。带状疱疹常发生于那些免疫应答处于抑制状态的个体或年老的人。对志愿者的研究表明，T细胞可以杀伤这些病毒。提前使用抗病毒的超免疫球蛋白可防止带状疱疹症状的发作。这种治疗方式建议只用于那些与带状疱疹有关的继发性感染患者，如那些患肺炎或大脑炎等危及生命疾病的患者。

概念检查

病毒性呼吸道疾病具有高度的传染性并且可能导致严重的健康问题。然而，通过恰当的免疫程序，普通的儿童病毒性疾病——麻疹、流行性腮腺炎、病毒性风疹和水痘都是可以控制的。

◆ 描述上述每种病毒感染的潜在严重后果。
◆ 明确对麻疹、流行性腮腺炎、病毒性风疹和水痘免疫的有效时期。

26.8 感冒和流行性感冒

感冒（cold）和流感（influenza）是最常见的传染病。如图 26.16 所示，流感和感冒病例分别是其他传染性疾病的 2 倍和 15 倍。这些病毒性感染通过咳嗽、喷嚏和呼吸道分泌物产生的液滴在人与人之间传播。

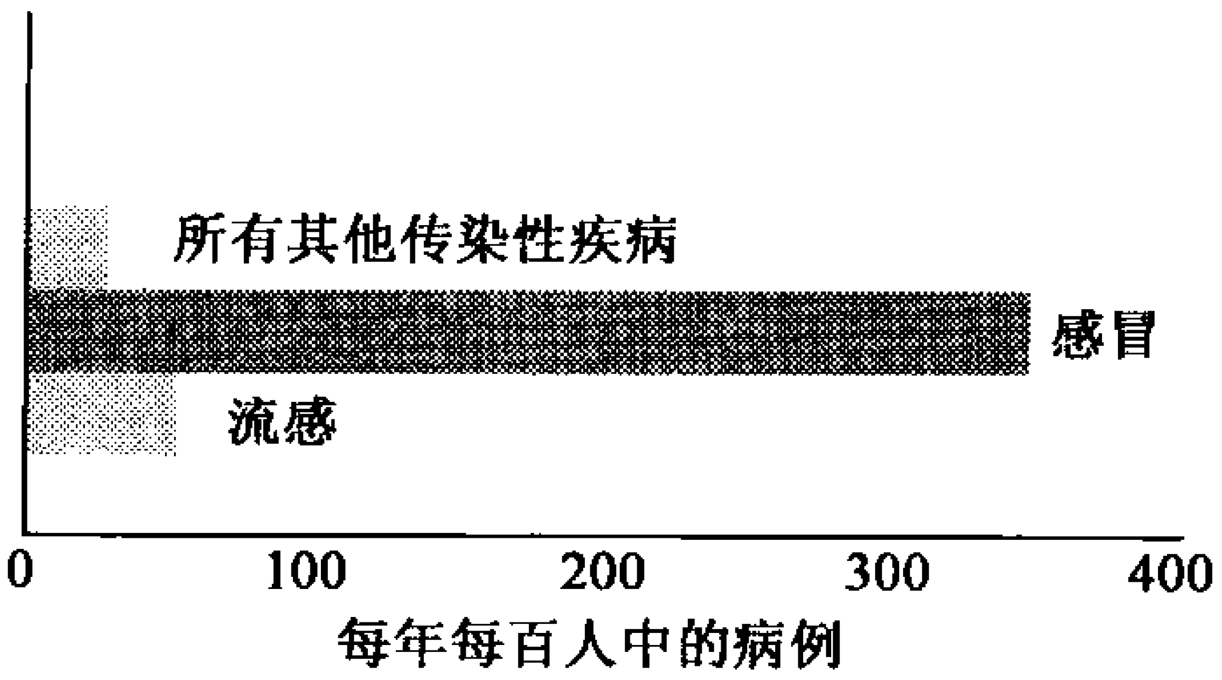


图 26.16　感冒和流感。在美国，这些病毒性疾病是最主要的急性传染病的诱因。这些是近几年的典型数据。

普通感冒和流行性感冒的症状通常看起来相似，其实它们的症状是截然不同的并且由十分不同的病毒引起。典型的普通感冒由鼻病毒（rhinovirus）引起，症状有流鼻涕、咳嗽、发冷和可能的喉痛。流感由正黏病毒（orthomyxovirus）引起，通常产生另一些症状。虽然都会引起疾病，但感冒通常持续时间短些，症状轻一些。表 26.1 比较了感冒和流感的症状。

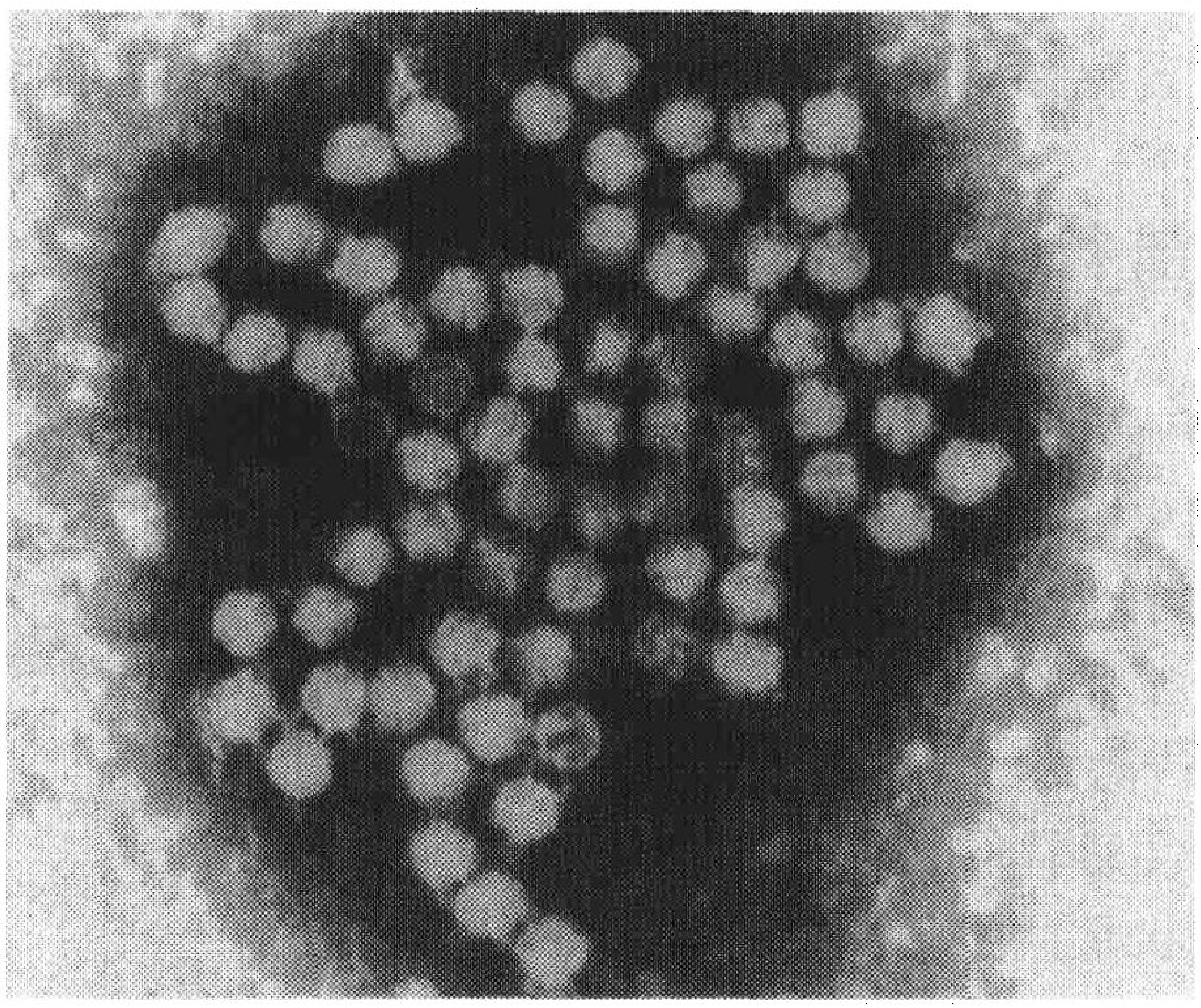
表 26.1　感冒和流感

症状	普通感冒	流感
发烧	少见	常见（39～40℃）；突然发作
头痛	少见	常见
不适感	轻微	常见；通常相当严重；持续几周
流鼻涕	常见和很多	不常见；通常不多
咽喉痛	常见	不常见
呕吐和（或）腹泻（diarrhea）	少见	常见于儿童

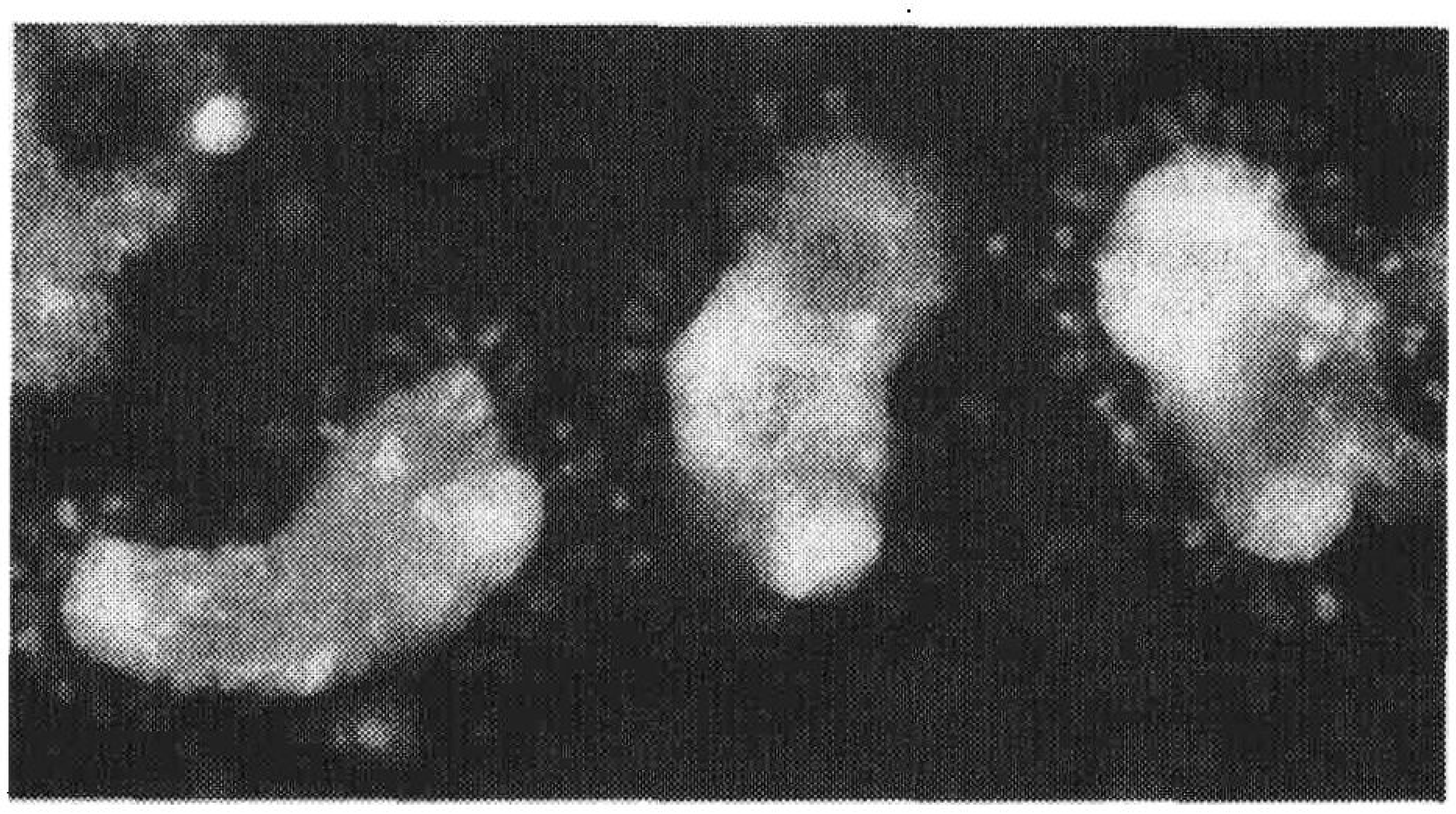
普通感冒

每人在他（她）的一生可能平均每年感冒三次以上（图 26.16）。感冒的症状包括鼻炎（鼻子区域发炎，尤其是鼻黏膜发炎）、鼻塞、流鼻涕和一些不适感觉，通常不伴随发烧。鼻病毒（rhinovirus）是一种单链的 RNA 病毒，为微小 RNA 病毒（picornavirus）中的一种（见 16.8 节和图 26.17a），是最常见的感冒病因。现知道鼻病毒的血清型已至少有 115 种。另一种单链 RNA 病毒是冠状病毒（*coronavirus*）（图 26.17b），造成约 15%的成人感冒。其他的病毒包括腺病毒（adenovirus），柯萨奇病毒（coxsackievirus）、呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus）和正黏病毒，造成 10%的普通感冒。感冒通常诱导特定的、局部的中和 IgA 反应（neutralizing IgA response）（见 22.9 节）。不过，由于可能的病毒类型太多，通过疫苗或以前接触获得对感冒的免疫是不太可能的。

空气传染可能是感冒病毒传播的主要方式，虽然对志愿者进行的试验证明直接接触和（或）与传染物接触也是一种重要的传播方式。尽管许多抗病毒的药物都是无效的，



(a)



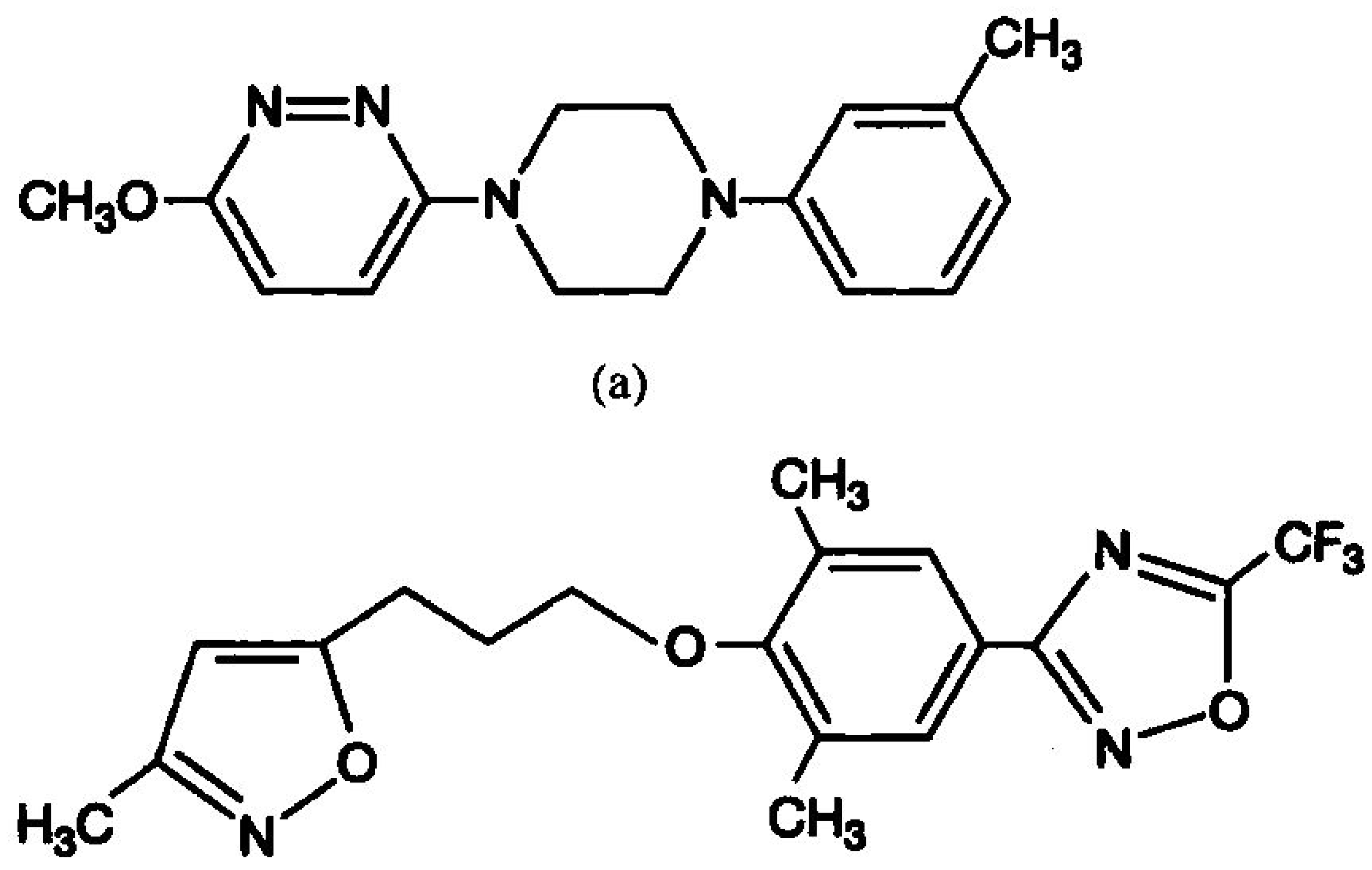
(b)

图 26.17　一些普通感冒病毒的电镜照片。(a) 人鼻病毒。(b) 人冠状病毒。每个鼻病毒粒直径约为 30nm，每个冠状病毒粒直径为 60nm。

但一种 pyrazidine 的衍生物（图 26.18a）证明有希望帮助人们在接触病毒后防止感冒。此外，人们正在根据三维结构获得的信息设计新的实验性抗病毒药物。例如，抗鼻病毒药物 WIN 52084（图 26.18b）可与病毒结合，转变病毒表面的三维构象，破坏它与宿主细胞受体 ICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）的结合，从而防止感染。α-干扰素为一种细胞因子（见 23.11 节），也可有效地防止感冒的发生。这样，已有几种实验上可能的方法对感冒进行预防和治疗，尽管其中没有一个被广泛认为安全有效的。由于感冒短暂和自愈，对感冒的治疗主要是针对它的症状。例如，流鼻涕，可使用抗组织胺和缓解充血药物。

流感

流感是由正黏病毒中的 RNA 病毒引起的（见 16.9 节）。流感病毒是一种单链负义 RNA 病毒，它的基因组 RNA 由包膜包围。包膜是由蛋白质、脂双层和伸展的糖蛋白组成的（图 16.17 和图 26.19）。*存在三种类型的流感病毒：流感病毒 A、B 和 C，这里*



(a)

(b)

图 26.18　实验性抗鼻病毒药物。（a）3-甲氧茎-6-［4-(3-甲苯基)］-1-哌嗪的结构。（b）受体阻断药物 WIN 52084 的结构。

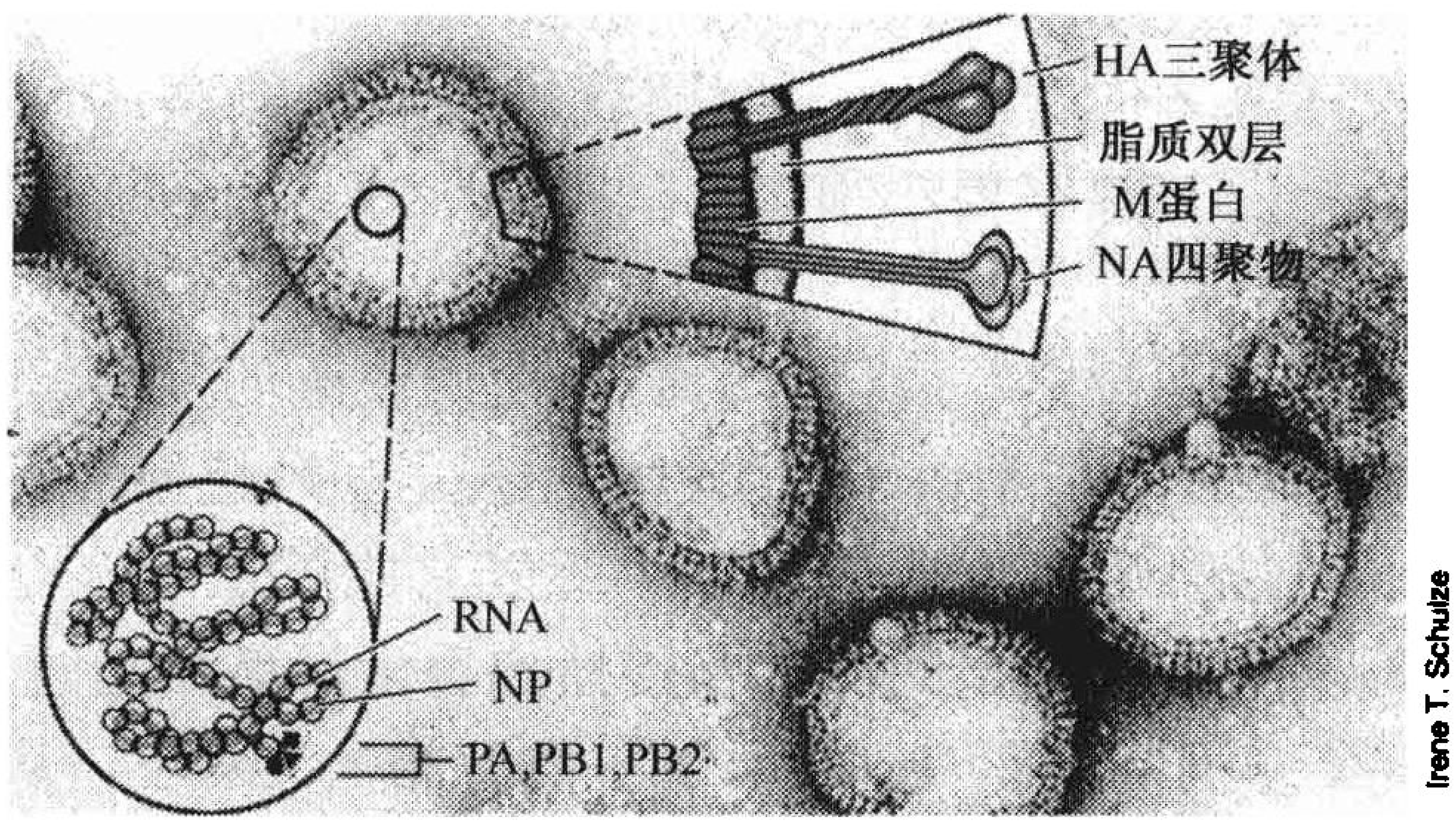


图 26.19　流感病毒的电镜照片。显示了病毒主要衣壳蛋白和核酸的位置。每个病毒粒直径约为 100nm。H：红细胞凝聚素（三个拷贝构成 HA 外壳突起）；NA：神经氨酸苷酶（4 个拷贝构成 NA 外壳突起）；M：外壳蛋白；NP：核蛋白；PA、PB1 和 PB2 为其他内在蛋白质，它们中的一些具有酶的功能。

我们只介绍最重要的人类病原体——流感病毒 A。

流感病毒 A 的基因组是单链 RNA，以一种非常不寻常的方式组织起来，就像 16.9 节中介绍的那样，流感病毒的基因组是不连续的（segmented），基因分布在单链 RNA 分子的 8 个不同的片段上（图 16.17）。如果有一株以上的流感病毒同时感染一个细胞的话，这种组织方式允许不同病毒株之间基因片段发生重新分配。这样，在被两个毒株感染的细胞中，RNA 片段的包装将以随机的方式进行，每个新生的完整病毒都含有来自原始病毒的经过随机重新分配的基因片段，具有独特重排模式的病毒就成了新的毒株。这种重新分配造成的现象称为抗原性转变（antigenic shift）。抗原性转变一般是病毒粒的蛋白质外壳发生较大的修饰，尤其是有关病毒附着和最终从宿主细胞释放的两个重要蛋白质——红细胞凝聚素（hemagglutinin，HA 或 H）和神经氨酸苷酶（neuraminidase，NA 或 N）（图 26.19 和图 16.17）。通过遗传变异（例如，基因片段上的点突变——更换了蛋白质上一或多个氨基酸），从而使 H 和 N 蛋白抗原获得微小的抗原性改变，这种现象称为抗原性漂变（antigenic drift）。

流感的流行病学

人类的流感病毒通过空气在人与人之间传播，主要通过咳嗽和打喷嚏时排出的雾滴。病毒感染上呼吸道黏膜系统，有时也侵入肺部。主要症状包括低烧 3～7 天、发冷、乏力、头痛、浑身疼痛（表 26.1）。流感通常自发而快速的病愈，大多数的严重后果是由于病毒感染造成抵抗力降低，于是细菌侵入，导致体内出现继发性感染而造成的。特别是在婴儿和老年人中，流感常伴随发生细菌性肺炎。如果发生死亡，一般都是细菌感染造成的。全世界每年，流感造成 300 万～500 万的严重病例，其中 25 万～50 万死亡。

大多数感染的个体都会对所感染的病毒产生免疫，那么抗原性相似的病毒在两三年内就不会引起流行。人类对流感的免疫主要依靠分泌型抗体（IgA，见 22.9 节），它专门针对红细胞凝聚素（H）和神经氨酸苷酶（N）的抗原决定簇。

流感作为一种地区性的病毒性疾病（endemic viral disease）存在于人群中，并且每年从晚秋到冬季的几个月里大范围地暴发。抗原性漂变（drift）造成人群免疫力下降从而导致流行病的复发，每 2～3 年为一个周期造成严重的局部（epidemic）流感暴发，而世界范围内的大型暴发其频率要小很多，周期从 10～40 年，并且是由抗原性转变（shift）所引起（见 25.3 节）。

1957 年那次称为“亚洲流感”的暴发为研究大型流感的发展提供了很好机会（图 26.20）。这种大型流感暴发可能是由于在人群中出现了一种抗原性不同于以往所有毒株的突变株。因为对该病毒株的免疫还未产生，所以它能够迅速在全世界范围内传播。1957 年 2 月首次出现在中国内地，到四月初传播到香港，然后通过军舰从香港传到加利福尼亚的圣地亚哥，五月在罗得岛纽波特的一艘海船上大暴发，从那时起，在美国的不同地区持续流行出现，十月达到高峰，共 2200 万新的病例出现。1918 年的大暴发，流感病毒 A 造成的“西班牙流感”在全世界杀死了 2 亿 3000 万人（图 25.1）。虽然大型流感周期性地出现，但是没有一次再同 1918 年那样是灾难性的。1918 年强毒力的原因尚不清楚。

现有证据将 1918 年和 1957 年的流感大暴发和猪体内禽类与人类流感病毒的重组联系了起来。猪的细胞上存在禽类和人类流感正黏病毒的受体并且能够结合及增殖禽类和人流感病毒的毒株。如果猪被禽类和人流感病毒毒株同时感染，这两种不相关的病毒就会发生重组（抗原性转变），独特的流感病毒将会产生，感染人类并且之前人类不会碰到过类似的抗原。这种病毒由动物毒株重排而来并感染人类的情况周期性地出现，但是何时出现并不可预测，也可能会在人群中随时迅速出现无前期免疫的强毒力毒株。

1997 年，香港出现了新的禽类流感病毒株，显然其宿主直接从禽跳到了人。这个流感病毒 A H5N1 型毒株也称为禽流感（avian influenza），造成了大量的感染和几例死亡，2004 年该型流感在越南再次出现。这种毒株除了由禽类宿主直接传播给人类之外，也可以仅在人类之间传播（长时间亲密接触之后）。然而，需要指出的是，H5N1 型也能感染猪，在猪体内完成与人类流感病毒的重排，这种重排将产生新的病毒，造成新的流感病毒大暴发。针对这种潜在毒株的疫苗正在开发中，以期提供适当的免疫。

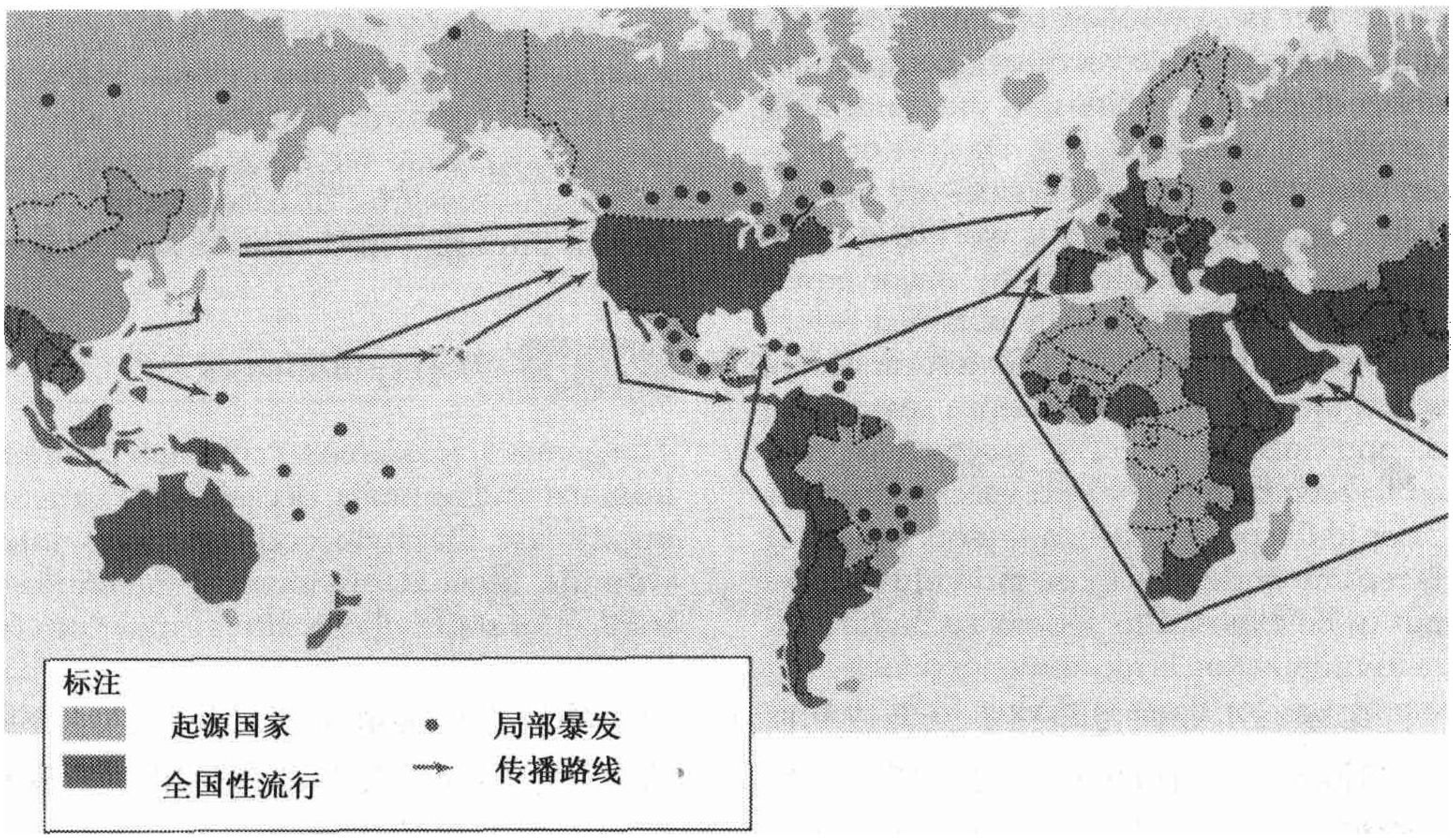


图 26.20　一次流感的大型暴发。显示了 1957 年亚洲流感的传播。这次暴发最初的流行焦点可能是中国。证据表明，涉及家禽和猪的农业生产及人类与这些动物的接触使得来自三种宿主的流感病毒的基因组发生重排。产生的新毒株人类对其还没有免疫记忆，从而快速且不可控制地传播造成大型流感的暴发。

流感的预防和治疗

通过免疫可以控制流感的流行。然而，由于存在很多不同的毒株并且这些毒株不断地发生抗原性漂变与转变，所以选择合适的疫苗非常复杂。当新病毒出现、疫苗不能马上获得时，可通过世界范围内的严密监视（见 25.9 节），在疾病流行以前获得出现的主要毒株的样本。在美国，每个流感季的末尾都会选取候选毒株，在鸡蛋中培养并灭活。灭活的病毒毒株混合起来，制成一种多价疫苗用于下一个流感季的提前免疫。对那些容易患致命性或严重的继发性疾病的人推荐进行流感免疫，例如，超过 50 岁的年老者、感染衰弱性慢性疾病的人（如 AIDS 患者，见 26.14 节）和健康护理人员。用灭活的流感病毒疫苗进行的有效人工免疫只能持续几年，而且是毒株特异性的，因此，免疫制剂每年都在升级。

流感病毒 A 也可以用金刚胺（amantadine）和金刚乙胺（rimantadine）加以控制，合成的胺类会抑制病毒的复制。神经氨酸苷酶抑制剂奥司他伟（oseltamivir）和扎那伟（zanavir）可以阻断流感病毒 A 和 B 的释放（见 20.10 节和表 20.5）。这些药物都用来治疗发作中的流感，缩短感染过程和降低感染的严重程度。在感染刚开始发生的时候，使用它们最有效。金刚胺、金刚乙胺和奥司他伟也可以作为有效的化学预防制剂防止流感的暴发和传播。

用阿斯匹林治疗流感尤其是治疗儿童流感并不可取，因为有证据表明阿斯匹林治疗流感与儿童患 Reye 综合征有关（一种罕见的、偶尔会造成包括中枢神经系统在内的致命性并发症）。

概念检查

感冒和流感是最常见的传染病。它们通常不是致命的疾病，但是会降低抵抗力使患者易患严重的继发性细菌感染。每年都会发生流感暴发，更严重的流行和大型的暴发是周期性的。

◆ 定义和比较流感与普通感冒的起因和症状，讨论针对二者的有效免疫程序的可能性。

◆ 辨别抗原性漂变和抗原性转变。

Ⅱ 直接接触传播的疾病

许多疾病主要通过与感染患者或其血液、分泌物的直接接触传播。我们已经介绍过的一些呼吸道疾病也可以通过直接接触传播。这里我们将介绍葡萄球菌感染、溃疡和肝炎，它们都是主要通过与感染个体的直接接触而在人与人之间传播的。

26.9 葡萄球菌

葡萄球菌属（*Staphylococcus*）包括一些常见的人和动物的病原菌，有时会引起致命性疾病。葡萄球菌通常感染皮肤和伤口。大多数的葡萄球菌感染都是这样发生的：已感染但是无症状个体的正常菌群中的葡萄球菌转移到易感个体。

葡萄球菌是革兰氏阳性球菌，直径 0.8～1.0μm，它们沿着几个平面分裂形成不规则的菌团（见 12.19 节和图 12.51）。葡萄球菌不产芽孢但是对干燥有一定的抗性，因此易分散在尘粒中通过空气和表面传播。对人类来说，有两种葡萄球菌是很重要的：表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*），不产色素，常存在于皮肤或黏膜上；金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*），产黄色素。虽然两种菌都是潜在的病原体，金黄色葡萄球菌更常见于人类的疾病。两种菌都频繁出现于上呼吸道和皮肤的正常菌群之中（图 26.2）。

流行病学和发病机制

葡萄球菌会引起多种疾病，包括痤疮（acne）、疖（boil，图 26.21）、丘疹（pimple）、脓疱病（impetigo，图 26.4）、肺炎、骨髓炎（osteomyelitis）、心脏病（carditis）、脑膜炎和关节炎（arthritis）。这些疾病很多都产脓，所以也被称为是化脓性的（pyogenic）。金黄色葡萄球菌常见的栖息地是上呼吸道，尤其是鼻和喉部及皮肤的表面。健康的人一般都是金黄色葡萄球菌的携带者，但是葡萄球菌的存在并不致病。很多婴儿在出生后一周内，从母亲或接触较密切的人那里感染到金黄色葡萄球菌。严重的金黄色葡萄球菌的感染通常发生在宿主抵抗力低比如激素失调、衰弱性疾病、创伤、固醇类或其他药物治疗导致的免疫系统弱化时。

那些常引起人类疾病的金黄色葡萄球菌菌株会产生大量的胞外酶和毒素（见 21.9

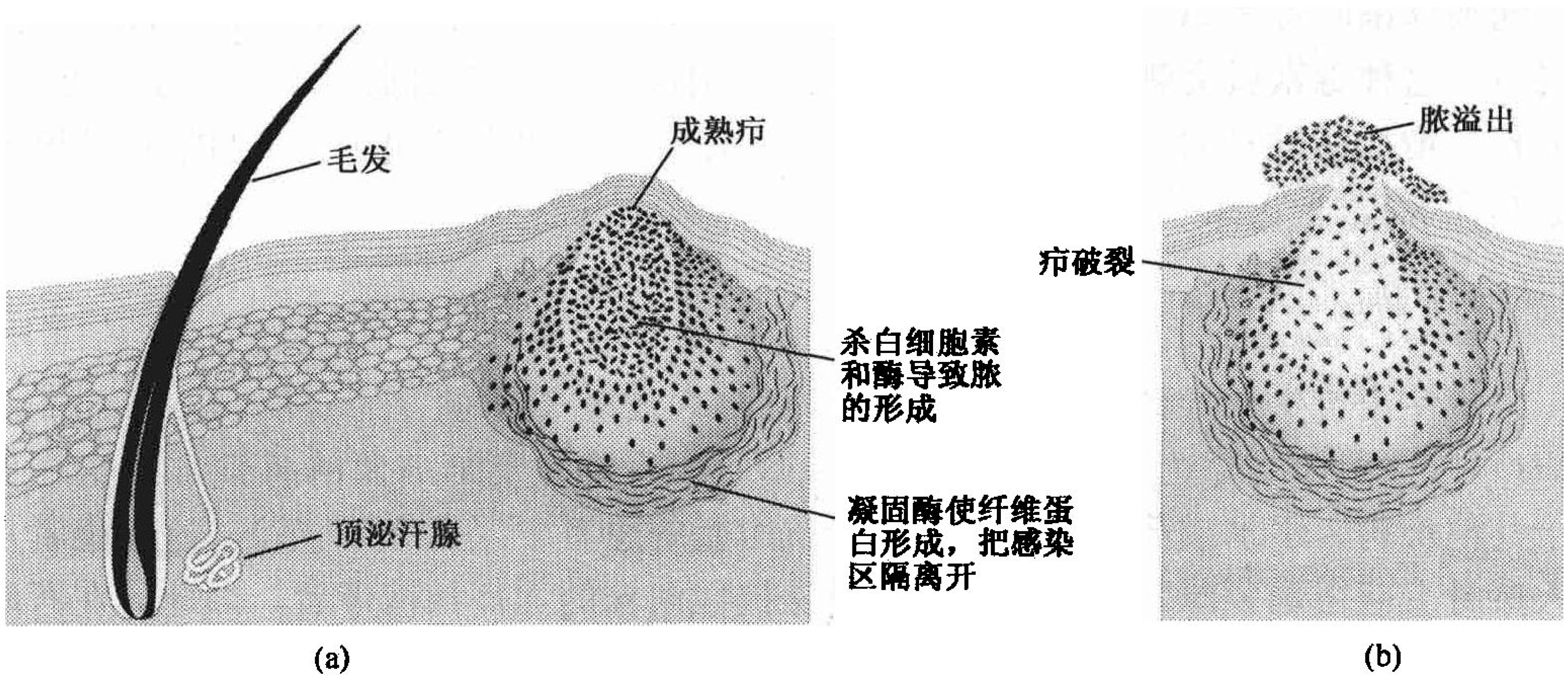


图 26.21　疖的结构。（a）葡萄球菌引起一个局部的皮肤感染，通过凝固酶的作用产生凝血和形成纤维蛋白，使感染处与其他部分隔开。（b）破裂的疖释放脓和细菌。

节）。现已发现至少有 4 种溶血素（hemolysin），且单个菌株可产生一种以上的溶血素，溶血素的分泌可使血琼脂板上的菌落周围产生溶血。金黄色葡萄球菌还可以产生肠毒素（enterotoxin），常与食物传染有关（见 21.11 节，22.16 节和 29.5 节）。所有的葡萄球菌也产生过氧化氢酶（catalase），将过氧化氢转换为水和氧气。过氧化氢酶不是毒力因子，但利用过氧化氢酶检测可以区分葡萄球菌和链球菌（不产该酶）。

金黄色葡萄球菌的另一个产物是凝固酶（coagulase），可以使纤维蛋白凝结成块（见 21.9 节）。凝固酶的产生常与致病性相关，这可能是凝固酶产生的凝块使纤维蛋白在细菌细胞的周围积累，这样使得宿主的防御介质与细菌的接触变得困难，并且使细菌能够抵抗吞噬（图 26.21）。大多数金黄色葡萄球菌还产生杀白细胞素（leukocidin），可使白细胞破坏。在皮肤损伤处，如疖和丘疹，产生的杀白细胞素，可使很多细胞破坏，这是脓形成的因素之一（图 26.21）。另外，一些金黄色葡萄球菌还产生其他的细胞外毒力因子，包括蛋白酶、透明质酸酶、纤维蛋白酶、脂酶、核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶（表 21.4）。

某些金黄色葡萄球菌与中毒性休克综合征（toxic shock syndrome，TSS）有关，这是一种葡萄球菌感染引起的严重疾病，常出现高烧、斑疹、呕吐、腹泻，有时会导致死亡。首次发现中毒性休克是在经期妇女中，并与使用的卫生棉有关。在女性经期，阴道中的血和黏液是来自皮肤的金黄色葡萄球菌的集落地，而卫生棉浓缩了这些物质，创造了理想的微生物生长条件。通过对女性的指导和变更卫生棉的材料，由于使用卫生棉而造成的中毒性休克已经相当少见。不过，中毒性休克综合征仍可见于术后感染葡萄球菌的男性和女性。

中毒性休克（TSS）症状是由一种称作中毒性休克毒素（toxic shock syndrome toxin，TSST）的外毒素间接引起的。TSST 是一种超抗原（见 22.16 节），由正在生长的葡萄球菌释放，可引起大量的 T 细胞反应导致超抗原反应的炎症反应特征。类 TSS 疾病也可由来自其他致病细菌的不同超抗原引起，其中包括酿脓链球菌（见 26.2 节）。

葡萄球菌肠毒素A也是一种超抗原，造成一种食物中毒。当食用了毒素污染的食物之后，这种毒素就会刺激T细胞在肠聚集，引起大量的T细胞反应，释放介质（mediator），增加肠的透性。葡萄球菌食物中毒的最终后果是严重的短时的腹泻和呕吐（见29.5节）。

治疗和预防

大量使用抗生素导致了金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）抗性菌株的筛选。医院（院内 nosocomial）抗性葡萄球菌的感染常发生在那些由于其他疾病、手术或药物治疗而造成抵抗力差的患者中（见25.7节）。这些患者从医务人员身上获得葡萄球菌，因为医务人员是抗性菌株的无症状携带者。因此，在医院内合理地使用抗生素药物治疗金黄色葡萄球菌感染是一个主要的问题。虽然一些通过人群获得的葡萄球菌感染可以用青霉素治疗，但从患者身上分离的金黄色葡萄球菌，必须单独进行抗生素敏感性检查（见24.3节）。

由于多数人是葡萄球菌的无症状携带者，而且诸如痤疮和脓疱病这类的疾病可以通过用污染的手指简单接触来传播，因此葡萄球菌感染的预防面临着问题。在诸如外科病房和婴儿室之类的医院环境中，对已知致病菌株的带菌者或者阻止其进入或者进行局部或系统的抗生素药物治疗以根除其带菌状态。

概念检查

虽然上呼吸道和皮肤上的葡萄球菌常是无害的，几种严重的疾病会由化脓性感染造成，其中有些是由葡萄球菌的超抗原引起的。

◆ 什么是金黄色葡萄球菌的常见聚集处？它是怎样在人与人之间传播的？

◆ 确认葡萄球菌食物中毒和中毒性休克综合征的机制。

26.10 幽门螺杆菌和胃溃疡

1983年，幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）首次在人体肠道组织活检中被发现，它是与胃炎（gastritis）、溃疡和胃癌有关的病原体。幽门螺杆菌是革兰氏阴性、高运动能力的螺旋形细菌，与弯曲杆菌（*Campylobacter*）相关（见29.2节和图26.22）。幽门螺杆菌长度2.5～3.5μm，直径0.5～1.0μm，有1～6根端生极鞭毛。幽门螺杆菌定植在不分泌胃酸的胃黏膜或包括十二指肠（duodenum）在内的上部肠道的黏膜上（见21.4节）。

流行病学

80%的胃溃疡（gastric ulcer）患者都伴有幽门螺杆菌感染，在发展中国家将近50%的无症状成人都有慢性感染。人与人之间的接触和食用污染的食物与水是幽门螺杆菌可能的传播方式。虽然目前还没有除人以外的幽门螺杆菌储存宿主，但有时在家养宠物猫的身上可以发现，表明它可以通过近距离接触在人和动物之间传播。感染在某些家

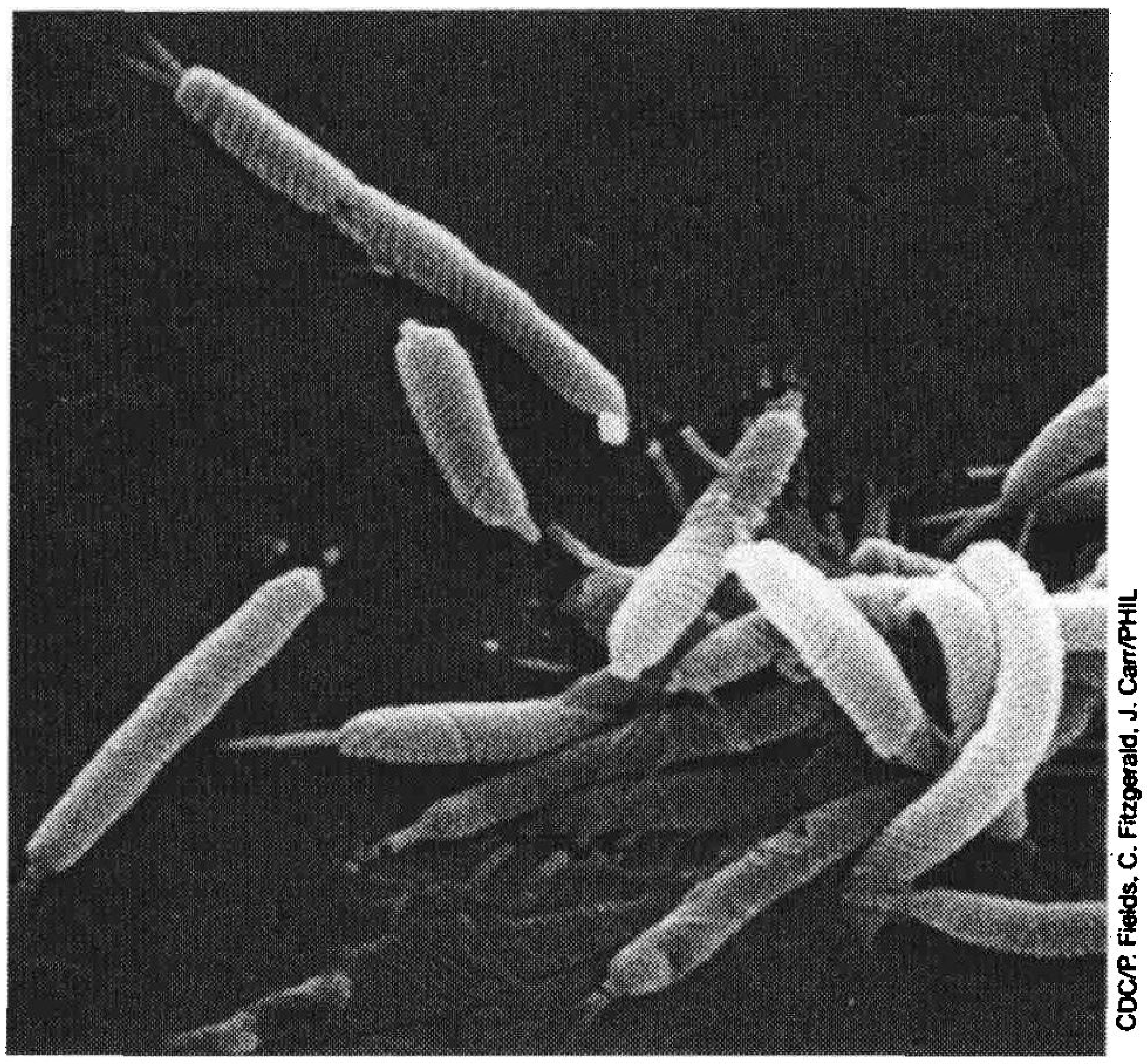


图 26.22　螺杆菌（*Helicobacter*）扫描电镜照片。该属很多成员的长度范围 1.5～10μm，直径范围 0.3～1.0μm。螺杆菌存在于哺乳动物和鸟类的肠道和肝脏部位。注意图中的有鞘鞭毛（sheathed flagella）。左下方的微生物长度 3.2μm。

庭内发病率很高。就整个人群来讲，发病率随着年龄增长而上升。这些因素都表明幽门螺杆菌是宿主到宿主型途径的传播（见 25.3 节，25.4 节和 25.5 节）。然而，有时候感染也会大面积流行，这表明幽门螺杆菌可能与食物或水等常见的污染源有关。

病理学、诊断和治疗

虽然幽门螺杆菌感染与溃疡之间明确的因果关系尚未建立，但目前的证据表明幽门螺杆菌是胃溃疡的主要病因，而且可以预防和治疗。它只有轻微的侵袭力，可以在胃黏膜表面定植，在那里受到胃黏膜层的保护而不受胃酸的影响。定植之后，产生的致病性物质与宿主的反应共同引起炎症、组织损伤和溃疡。致病性物质包括 vacA（一种细胞毒素，表 21.4）、脲酶（urease）和脂多糖（lipopolysaccharide），可能会造成局部组织损伤和溃疡。被感染的个体通常会产生抗幽门螺杆菌的抗体，但是没有保护作用且不能阻止定植。感染幽门螺杆菌的个体都倾向于慢性长期的感染，除非他们接受抗生素治疗。不加治疗的幽门螺杆菌感染引起的慢性胃炎可能发展成胃癌。

幽门螺杆菌感染的临床表征为胀气和胃（腹上部）疼，确诊则需要从对胃溃疡组织的活检中活化并培养出或观察到幽门螺杆菌。血清中的抗体表明有幽门螺杆菌感染，但是既然感染是慢性的而且抗体能够在感染后几个月持续存在（见 24.7 节），因此幽门螺杆菌抗体不是发生急性活跃感染的可信的标示。有一个用于幽门螺杆菌代谢检测的简单的体内测试——脲酶检测。在这个检测中，患者摄入 ^{13}C 或 ^{14}C 标记的尿素，如果患者呼出带标记的 CO_2 则表明有脲酶的存在，而脲酶几乎只有幽门螺杆菌才能产生。从粪便中如果发现了幽门螺杆菌或其抗原也表示存在感染。

幽门螺杆菌与溃疡之间因果关系的证据来自对疾病的抗生素治疗结果。用抗酸剂对

大多数溃疡患者进行长期的治疗并不能获得成功，大多数患者在一年以内又会复发。但是如果把溃疡作为传染病加以治疗，通常可以彻底治愈。一般使用多种药物混合加以治疗，包括灭滴灵（metronidazole）、四环素或阿莫西林（amoxycillin）及含铋的抗酸剂。混合治疗 14 天可以清除幽门螺杆菌感染，达到长期治愈的效果。

概念检查

幽门螺杆菌感染似乎是引起胃溃疡的最常见的原因。现在治疗胃溃疡使用抗生素，可以促进永久性治愈。

◆ 描述幽门螺杆菌感染及其向溃疡的发展。

◆ 指出证明幽门螺杆菌在人和人之间感染及可以通过常见感染源传播的证据。

26.11 肝炎病毒

肝炎（hepatitis）一般是由某种传染性病原体引起的肝脏炎症。肝炎有时导致急性疾病，伴随功能性肝脏结构和细胞的损伤，这种情况称为肝硬化（cirrhosis）。感染造成的肝炎可引起慢性或急性疾病，其中一些导致肝癌。虽然许多病毒和少数细菌能引起肝炎，但是与肝病有关的病毒只有有限几类。肝炎病毒都是反转录病毒，相互之间无遗传相关性，但是都感染肝部的细胞引起肝炎。表 26.2 详细说明了已知的 6 种肝炎病毒（hepatitis virus）。

表 26.2 肝炎病毒

病症	病毒及基因组	疫苗	病情	传播途径
甲型肝炎	*Hepatovirus*（HAV）ssRNA	有	急性	胃肠内
乙型肝炎	*Orthohepadnavirus*（HBV）dsDNA	有	急性、慢性、致癌	胃肠外，性
丙型肝炎	*Hepacivirus*（HCV）ssRNA	无	慢性、致癌	胃肠外
丁型肝炎	*Deltavirus*（HDV）ssRNA	无	暴发性，仅伴乙肝	胃肠外
戊型肝炎	*Calciviridae family*（HEV）ssRNA	无	孕妇中的暴发性疾病	胃肠内
庚型肝炎	*Flaviviridae family*（HGV）ssRNA	无	无症状	胃肠外

流行病学

甲肝病毒（hepatitis A virus，HAV）通过人与人的接触或人摄入排泄物污染的食物或水进行传播，通常称为传染型肝炎（infectious hepatitis），引起轻度的甚至是亚临床的感染，但也有少数情况造成严重的肝病。最重要的甲肝病毒食物载体是有壳水生物，如人类排泄物污染的水中牡蛎和蛤。然而，近年来甲肝病毒也通过新鲜的农产品传播。2003 年，美国东部一次重大的暴发就是因为人们食用生的或半生的洋葱造成的。HAV 感染数量总趋势在下降（图 26.23），部分是由于有效疫苗的使用。HAV 引起的病毒性肝炎比其他任何病毒引起的都多，在美国超过 30%的人带有 HAV 的抗体，说

明他们都曾经被感染过。

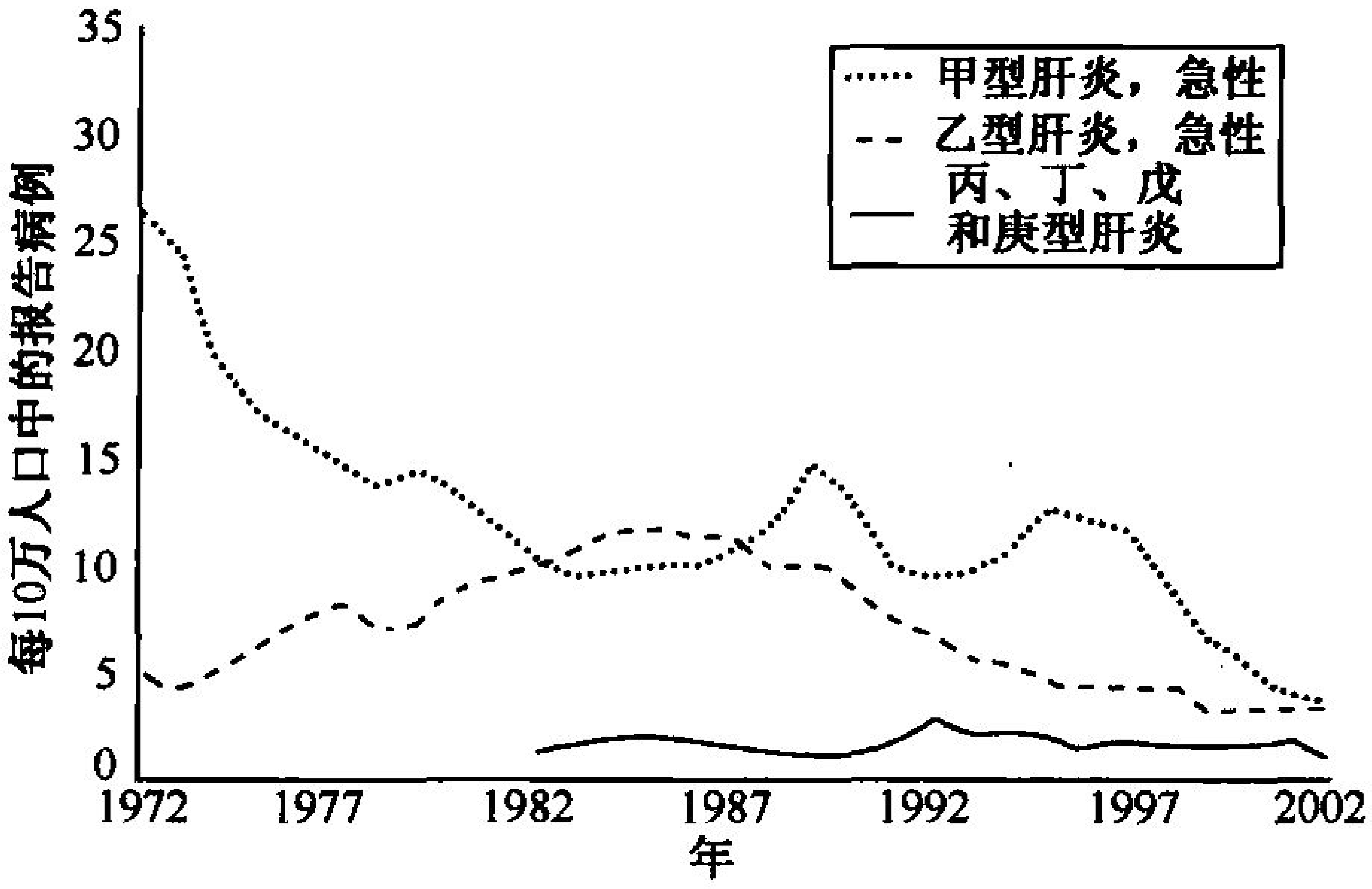


图 26.23 美国的肝炎情况。显示了病毒性肝炎的流行情况。2002 年有 8795 例甲肝，7996 例乙肝和 1835 例其他肝炎（大部分由 HCV 引起）。数据从美国佐治亚州亚特兰大疾病控制与预防中心获得。

乙肝病毒（hepatitis B virus，HBV）感染通常称为血清型肝炎（serum hepatitis)。HBV 是一种 DNA 肝炎病毒（hepadnavirus，见 16.15 节)，是部分双链 DNA 病毒。成熟的病毒颗粒含有病毒基因组被称为邓氏颗粒（Dane particle)（图 26.24)。HBV 引起急性的、通常很严重的疾病，可能导致肝功能衰竭和肝脏坏死。慢性 HBV 感染会造成肝硬化和肝癌。HBV 一般通过胃肠外途径（parenteral route）传播，例如，输血或共用被感染的血液污染的皮下注射针头。HBV 也通过体液的交换传染，如性交。同样由于有效疫苗的使用，HBV 感染的新病例在减少。然而，每年仍有大约 5000 人死于慢性 HBV 感染的并发症，如癌症。

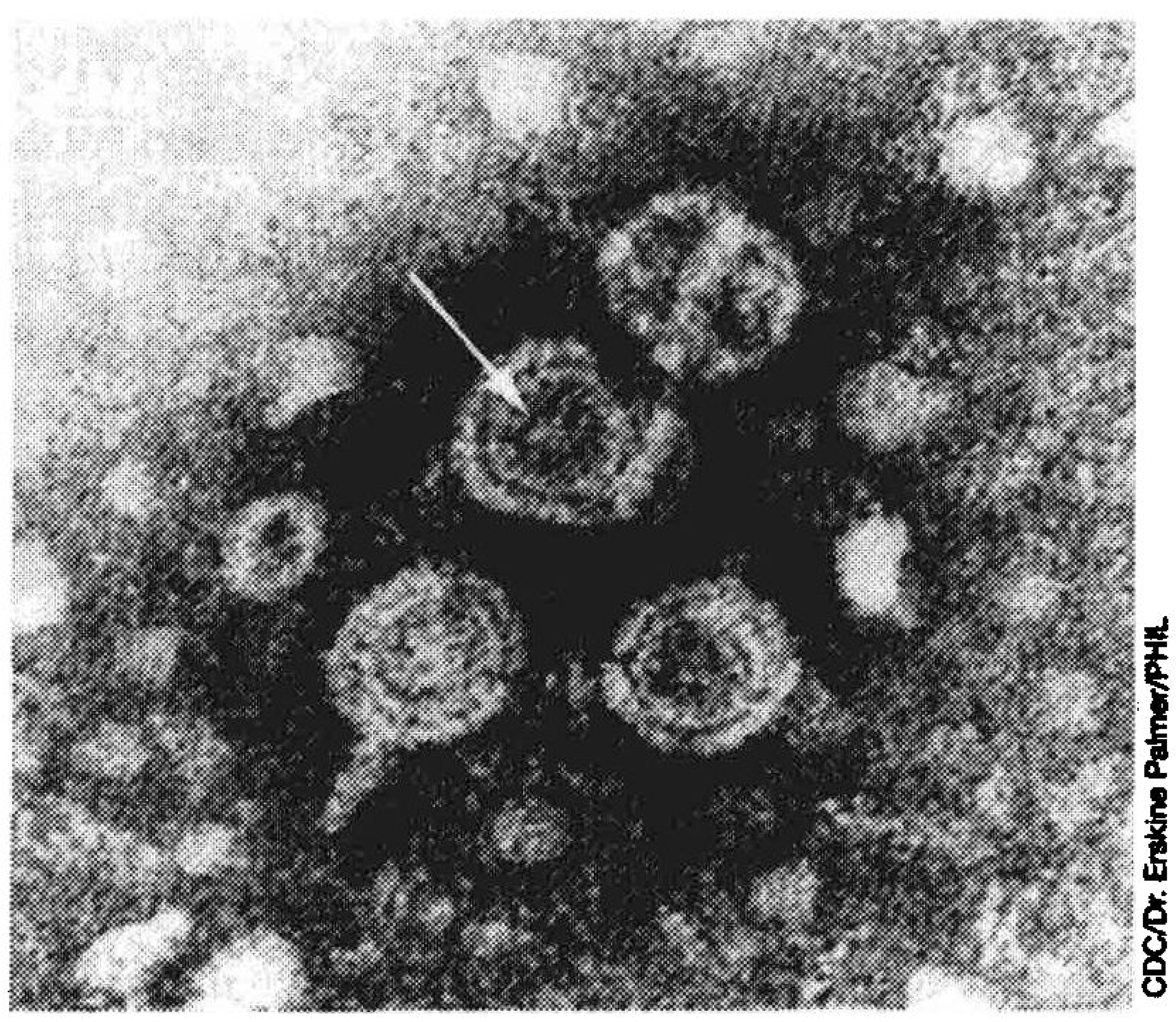


图 26.24 乙肝病毒（HBV)。箭头所指是一个完整的 HBV 病毒颗粒，直径大约 42nm，称为邓氏颗粒（见 16.15 节和图 16.27)。

丁肝病毒（hepatitis D virus，HDV）是一种缺陷的病毒（defective virus)，没有自身蛋白质外壳的编码基因（见 16.15 节)。HDV 也通过胃肠外途径传播，不过既然

是缺陷的病毒，除非细胞也感染了 HBV，否则不能够复制和表达完整的病毒：HDV 基因组独立复制但使用 HBV 的蛋白质外壳进行表达。这样，HDV 感染通常看作是 HBV 的共感染。

丙肝病毒（hepatitis C virus，HCV）也是胃肠外途径传播的。HCV 通常首先引起症状轻微甚至没有症状的疾病，但是将近 85%的患者发展成慢性肝炎，其中近 20%导致慢性肝病和肝硬化。每年感染患者中有 3%～5%的慢性感染造成肝癌（hepatocarcinoma），从初次感染到发展成癌症潜伏期可能有几十年。在美国，每年报告的 HCV 新病例（图 26.23）仅仅是大约 25 000 个新发生感染的一小部分。发展为肝癌的慢性 HCV 感染每年造成大量死亡，美国每年 HCV 诱发的肝病是目前临床上最常见的肝病，每年肝癌、其他慢性肝病和肝硬化所导致 25 000 死亡中的将近 10 000 是与 HCV 有关的。

戊肝病毒（hepatitis E virus，HEV）通过胃肠内途径（enteric route）传播肝炎。HEV 引起急性自限性肝炎，不同病例的严重程度不同，常是怀孕妇女快速暴发性疾病的病因。戊肝是墨西哥和非洲及亚洲的热带与亚热带地区的地方性疾病。

庚肝病毒（hepatitis G virus，HGV）常见于其他型急性肝炎患者的血液中，单独的 HGV 看来只引起很轻微的症状甚至完全没有症状。几种来自志愿献血者的不同样品检测出了高达 8.1%的 HGV 阳性，不过既然 HGV 与已知的临床疾病都没有关系，这些发现的意义尚不清楚。

病理学和诊断

肝炎是一种肝的急性疾病，症状包括发烧、皮肤黄疸（jaundice，由于肝细胞被破坏，肝脏产生并释放过多的胆红素，使得皮肤发黄）、眼球黄疸（icterus，白眼球变黄）、肝肿大（hepatomegaly，肝脏增大）和肝硬化（正常肝组织构造崩溃，包括纤维化）。可通过肝脏中相对次要的酶（如丙氨酸氨基转移酶 ALT）浓度的上升检测轻度肝炎，暴发性疾病则通过快速发作的严重症状（如黄疸和肝硬化）进行判断，后者一般有生命危险。不同的肝炎病毒引起相似的急性临床疾病并且仅通过临床观察很难区分。慢性肝炎感染一般由 HBV 或 HCV 引起，通常无症状或症状轻微，但是它们会造成严重的肝病（即便不包括肝癌也是如此）。

肝炎的诊断主要依靠临床观察和实验检测来确认肝脏功能的问题。通过进行肝脏组织的活体检查诊断肝硬化；许多病毒特有的测试也用于确认病情、鉴定感染病原体及决定治疗的过程。直接培养肝炎病毒通常无助于鉴定，而且 HCV 和 HGV 无法培养成功。

酶联免疫检测法（ELISA，见 24.10 节）是被最广泛采用的鉴定肝炎的方法之一。多数 ELISA 方法被设计用来鉴定血液样本中的病毒蛋白。是否存在 HBV 的 IgM 或 IgG 抗体（antibody）可以被有效地检测出来。IgM 与 HBV 的初级免疫应答有关，IgG 与 HBV 的次级应答有关。因此，鉴定抗体的类型可以确定 HBV 的感染是新的感染（IgM），还是造成次级应答的慢性或潜伏期 HBV 感染（IgG）（见 22.9 节）。肝炎病毒的其他免疫检测方法还包括免疫印迹（immunoblot，见 24.11 节）、免疫电子显微镜（immunoelectron microscopy，IEM，见 24.13 节）和免疫荧光（immunofluorescence，

见 24.9 节)。

以 PCR 为基础的检测和 DNA 点杂交(见 24.12 节)也可用于血液中或活检得到的肝脏组织中病毒基因组的检验。

预防和治疗

通过接种有效的疫苗可以预防 HAV 和 HBV 的感染。在美国,推荐并要求学龄儿童接种 HBV 疫苗(见 22.13 节)。没有针对其他肝炎病毒的有效疫苗。

为了预防血液传染病的传播,法律规定了"通用防范措施"(universal precautions),主要针对 HBV 感染和人类免疫缺陷病毒(HIV,见 24.4 节)。这些标准为负责处理有感染性的废物和体液的人员强制性规定了防范措施,用来预防所有胃肠外传播型肝炎病毒(HBV、HCV、HDV 和 HGV)的感染。并规定了严格的警戒水平、无菌处理和隔离程序来处置患者、体液和污染物。

甲型肝炎能够通过常见污染源如食物和水进行传播,通过保持供应无病原体污染的食物与饮水就可以防止甲型肝炎的流行性暴发(第 28 章和 29 章)。

肝炎的暴露后治疗(postexposure treatment)有时是可行的。如果在接触病毒后马上使用备用的人 γ 免疫球蛋白可以防止 HAV 的感染。对 HBV 感染的暴露后预防,特定的乙肝免疫球蛋白与 HBV 疫苗共同施用是有效的措施(见 22.13 节)。

对肝炎大多数的治疗是支持性的——提供休息和时间以使肝脏损伤得到减轻和修复。某些情况下,使用一些抗病毒药物会有效果。对某些患者,α 干扰素与利巴韦林(ribavirin)合用对 HCV 有效。HBV 可以用抗病毒药物膦甲酸(foscarnet)、利巴韦林、拉米夫定(lamivudine)和更昔洛韦(ganciclovir)治疗(见 20.10 节)。

概念检查

由病毒引起的肝炎会造成一种急性肝病——肝硬化。HBV 和 HCV 能引起导致肝癌的慢性感染。针对 HAV 和 HBV 的疫苗是有效的。近 20 年,在美国,肝炎的总流行程度明显下降,但是由于其高度的传染性,病毒性肝炎仍然是公共健康的主要问题。

◆ 描述甲肝、乙肝和丙肝病毒的传播模式。

◆ 描述预防和治疗甲肝与乙肝的有效方法。

Ⅲ 性传播的感染

几种重要的人类病原体主要通过性接触传播。这些病原体引起性传播的感染(sexually transmitted infection,STI)。

STI 又称性传播疾病(sexually transmitted disease,STD)或性病(venereal disease),是由多种细菌、病毒、原生动物甚至真菌引起的(表 26.3)。与呼吸道病原体被感染个体持续地大量释放不同,性传播的病原体通常仅存在于来自泌尿生殖器官并通过性行为发生交换的体液中,这是因为性传播的病原体对干燥或其他的环境压力(如热和光)非常敏感,而它们的栖居地——人类的生殖器官具有保护作用的潮湿环境。这样,

这些微生物优先而且有些只定植于生殖器官。

表 26.3 性传播的疾病及治疗指导

病症	致病微生物[a]	推荐的治疗措施[b]
淋病	淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）(B)	头孢克肟（cefixime）或头孢曲松（ceftriaxone）和阿奇霉素（azithromycin）或强力霉素（doxycycline）
梅毒	苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*）(B)	苄星青霉素 G（benzathine penicillin G）
砂眼衣原体感染	砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）(B)	强力霉素或阿奇霉素
非淋菌性尿道炎（nongonococcal urethritis）	砂眼衣原体（B）或解脲脲支原体（*Ureaplasma urealyticum*）（B）或生殖道支原体（*Mycoplasma genitalium*）（B）或阴道毛滴虫（*Trichomonas vaginalis*）(P)	阿奇霉素
性病淋巴肉芽肿（lymphogranuloma venereum）	砂眼衣原体（B）	强力霉素
软下疳（chancroid）	杜氏嗜血菌（*Haemophilus ducreyi*）(B)	阿奇霉素
生殖性疱疹（genital herpes）	单纯疱疹病毒 2 型（Herpes simplex type 2）(V)	无有效的治愈的方法，可局部使用阿昔洛韦（acyclovir）控制症状（图 26.31）
生殖性疣（genital warts）	乳头状病毒（Papilloma virus）（某些株）	无有效的治愈的方法，疣可用外科手术和化学方法去除，或冷疗法
滴虫病	阴道毛滴虫（P）	灭滴灵
获得性免疫缺陷综合征（AIDS）	人免疫缺陷病毒（HIV）	无有效的治愈的方法，对某些病例，核苷碱基类似物、蛋白酶抑制剂、融合抑制剂（fusion inhibitor）与非核苷反转录酶抑制剂（nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor）在临床上有效（表 26.4）
盆腔炎（pelvic inflammatory disease）	淋病奈瑟氏球菌（B）或砂眼衣原体（B）	头孢替坦（cefotetan）
外阴阴道念珠菌病（vulvovaginal candidiasis）	白假丝酵母（*Candida albicans*）(F)	布康唑（butoconazole）

a. B，细菌；V，病毒；P，原生动物；F，真菌。
b. 公共健康服务部，美国健康与人类服务署的建议。许多药物有不少可能的替代品。

由于存在许多社会学和生物学的原因，对 STI 有效的诊断和治疗非常困难。首先，将近 1/3 的 STI 患者是十几岁的有多个性伴侣的青少年，这就使得鉴定感染源和阻止疾病的传播变得困难；其次，许多 STI 患者症状轻微并且感染个体不寻求治疗；第三，患性病影响社会声誉，很多患者因此不寻求积极的治疗。然而，出于以下众多原因，又很期望对 STI 进行积极有效的治疗。首先，大多数 STI 都可治愈并且事实上全部可以通过合适的医疗手段进行控制；其次，对性病治疗的延误或缺乏会导致长期的问题，如不育、癌症、心脏病、退化性神经疾病和胎儿先天缺陷或死胎。

由于 STI 的传播通常限于性行为中的私密性身体接触，可以通过节欲（不交换体液）或使用隔离物（如保险套在性行为中阻止体液的交换）来控制性病的传播。

STI 非常常见并持续地引起社会和医学问题。在此我们介绍一些流行性 STI。

26.12 淋病和梅毒

淋病（gonorrhea）和梅毒（syphilis）是可被预防和治愈的 STI。由于其症状不同，流行的总趋势十分不同。淋病比较流行，通常是无症状的，尤其是在妇女中，因此淋病一般不被发现也得不到治疗。梅毒不同，现今只有很低的流行性，部分的原因是梅毒的一期就有非常明显的症状并且感染个体通常立即寻求治疗（图 26.25）。

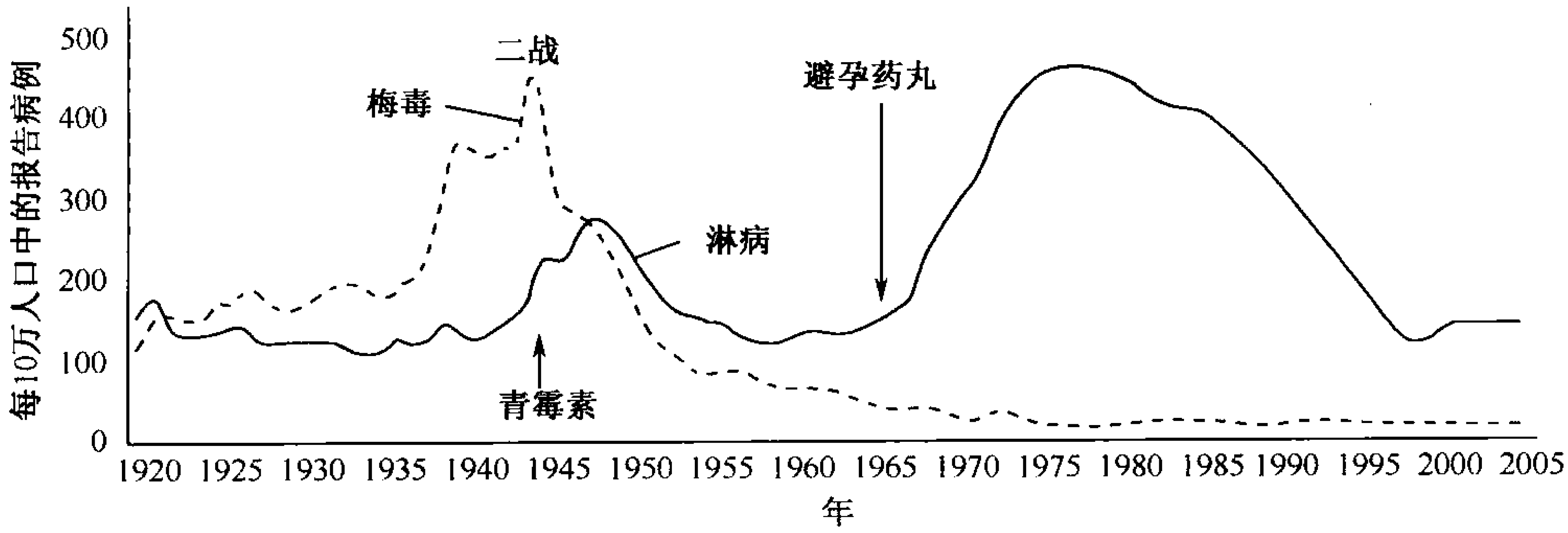


图 26.25　美国报告的淋病和梅毒病例。注意在使用抗生素后疾病发病率的下降趋势和使用避孕药丸后淋病发病率的上升趋势。2002 年美国有 351 852 例淋病和仅 6862 例梅毒。

淋病

淋病奈瑟氏球菌（*Neisseria gonorrhoeae*），通常称作淋球菌（*gonococcus*），引起淋病。淋病奈瑟氏球菌是革兰氏阴性、不产芽孢、专性需氧、氧化酶阳性的双球菌（见 12.10 节），在生化特征和系统发生学上与脑膜炎奈瑟氏球菌有关（见 26.6 节）。淋病奈瑟氏球菌对干燥非常敏感，正常情况下离开生殖器官的黏膜就不能存活（图 26.26）。干燥、阳光和紫外线可以快速地杀死淋球菌。由于它对环境条件的极端敏感性，淋病奈瑟氏球菌只能通过人与人之间私密的接触传播。病原体通过生殖器官的黏膜进入机体。

男性与女性患淋病的症状有很大的差别，女性的症状常为温和的阴道炎，很难与其他生物引起的阴道感染相区别，而且这种感染很容易被忽视。在女性中，未被治疗淋病的并发症可导致盆腔炎（pelvic inflammatory disease，PID）。PID 是一种会造成长期并发症（如不育）的慢性炎症疾病。但在男性中，这种微生物却引起尿道管疼痛性感染（图 21.11）。对男性和女性两者都有影响的未被治疗淋病的并发症包括免疫复合物沉淀造成的心脏瓣膜和关节组织的损伤（见 22.15 节）。

除了淋病，该微生物还会引起新生儿眼部的感染。母亲患有淋病的婴儿可能在出生过程中受到眼部的感染，因此，强制性的对所有新生儿的眼睛用含有红霉素的药膏进行预防治疗以预防婴儿受淋球菌感染。我们在 24.1 节中对淋病的临床微生物学和诊断进行了介绍。

过去用青霉素治疗淋病很成功，但是自 20 世纪 80 年代以来，对青霉素产生抗性的

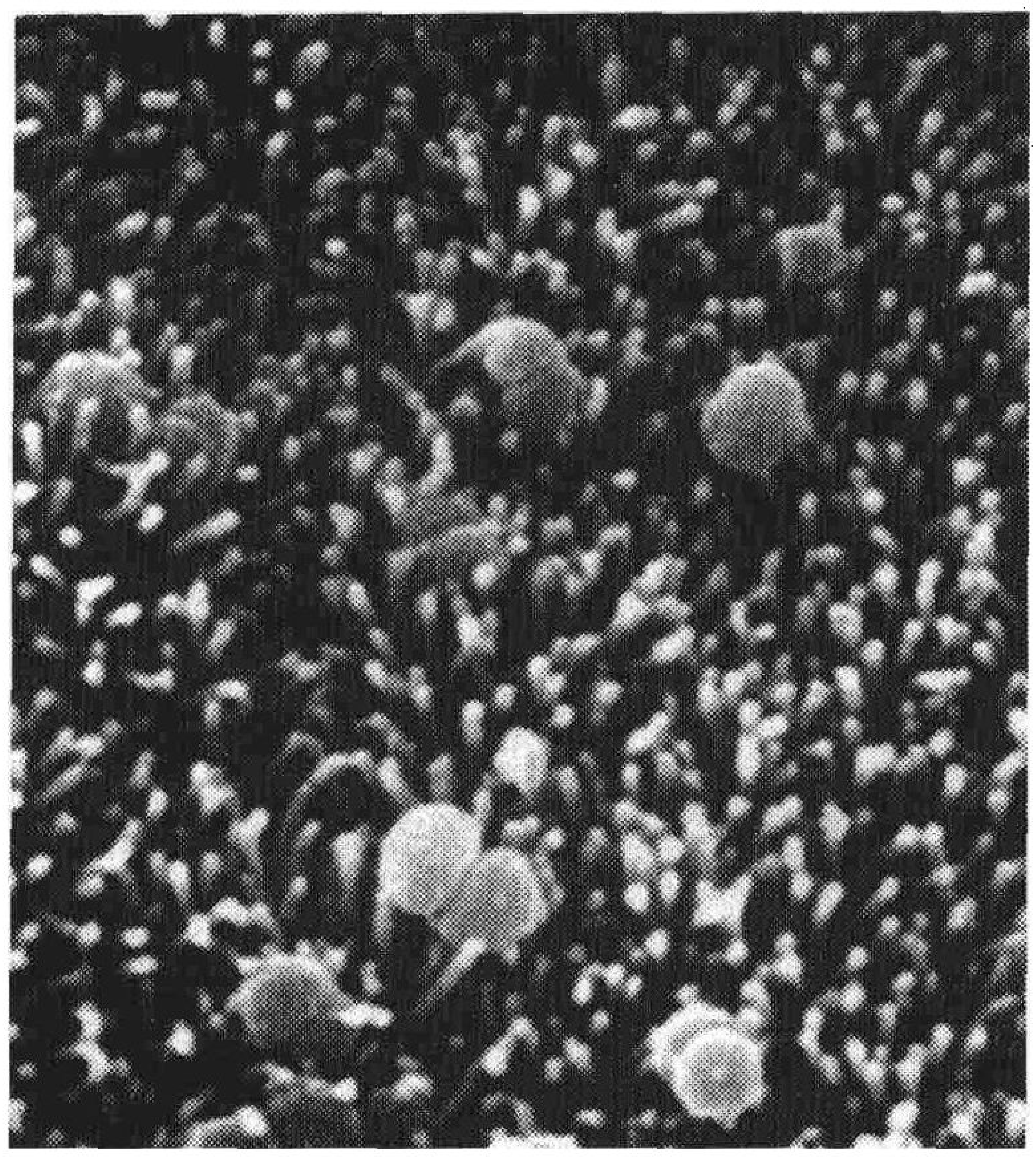


图 26.26　淋病的致病因——淋病奈瑟氏球菌。人类输卵管黏膜绒毛的扫描电子显微镜照片，显示了淋病奈瑟氏球菌细胞是怎样黏附到上皮细胞的表面。注意其独特的双球菌形态，淋病奈瑟氏球菌细胞直径约为 0.8μm。

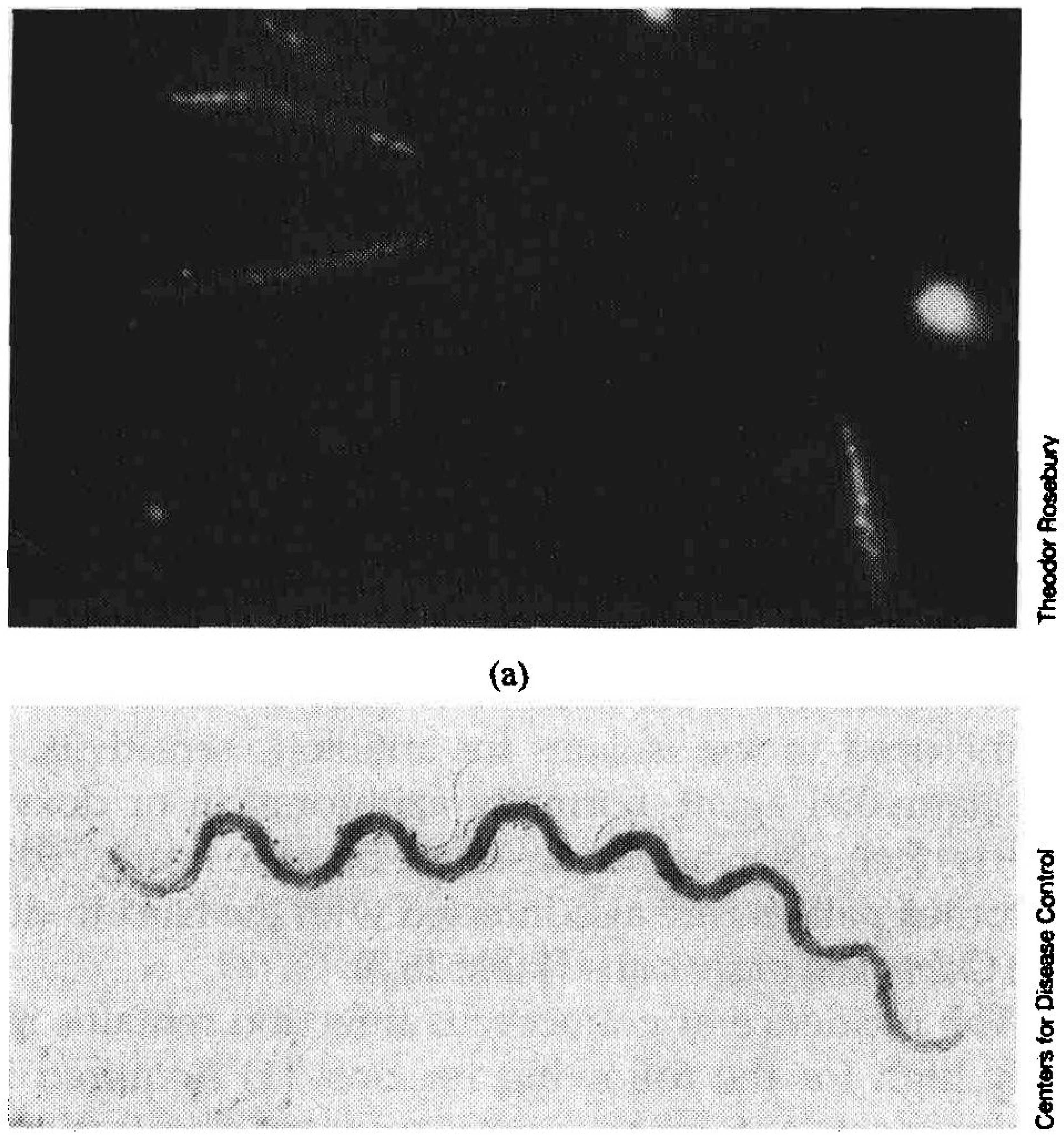
淋病奈瑟氏球菌开始出现，到现在已经广为传播。好在替代的抗生素治疗（单剂量的β-内酰胺类抗生素头孢克肟或头孢曲松）对产青霉素酶的菌株有效，也可以使用喹诺酮类抗生素环丙沙星（ciprofloxacin）、氧氟沙星（oflaxacin）或左旋氧氟沙星（levofloxacin）。然而，到 2001 年，夏威夷 14.3%的淋病奈瑟氏球菌分离株对喹诺酮有抗性，表明需要对分离株进行抗生素敏感性检测。由于几乎一半的淋病患者同时也被很难诊断出的砂眼衣原体感染，治疗淋病时通常同时使用一种抗衣原体药物，一般是阿奇霉素或强力霉素（表 26.3）。

淋病感染的发病率还是相当高，主要原因有 3 点：①因为不存在获得性免疫，因此有可能出现重复感染。虽然能产生抗体，但是或者无保护作用；或者菌株是特异性的，不能提供交叉免疫。在一株淋病奈瑟氏球菌内，也可发生抗原转变，改变混浊蛋白抗原（opacity protein antigen，Opa）和表面菌毛蛋白抗原（surface pilin antigen）。这些改变会产生新的血清型，显然会阻止有效的免疫。②口服避孕药的使用改变了局部黏膜环境，使之更易于病原体的生长。口服避孕药诱导机体“假怀孕”，这样除其他情况外还会造成阴道糖原合成缺乏和阴道 pH 增高的后果。在成人阴道中正常的乳酸菌菌群在这种情况下不能形成，从而使从感染伴侣处传染的淋病奈瑟氏球菌得以定植（见 21.5 节）。③在女性中的症状太温和以至于不被发现，一个滥交的女性患者能使很多男性感染。如果这种性接触传染被及时发现，并加以治疗，那么这种疾病就能很快控制。但这种信息的获得十分困难，而且安排治疗就更加困难。

梅毒

梅毒是由一种螺旋体（spirochete）——苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*）引

起的。苍白密螺旋体长 10～15μm，直径大约 0.15μm（图 26.27)。螺旋体对环境压力极端敏感，因此梅毒一般通过私密的性接触在人与人之间传播。



(a)

(b)

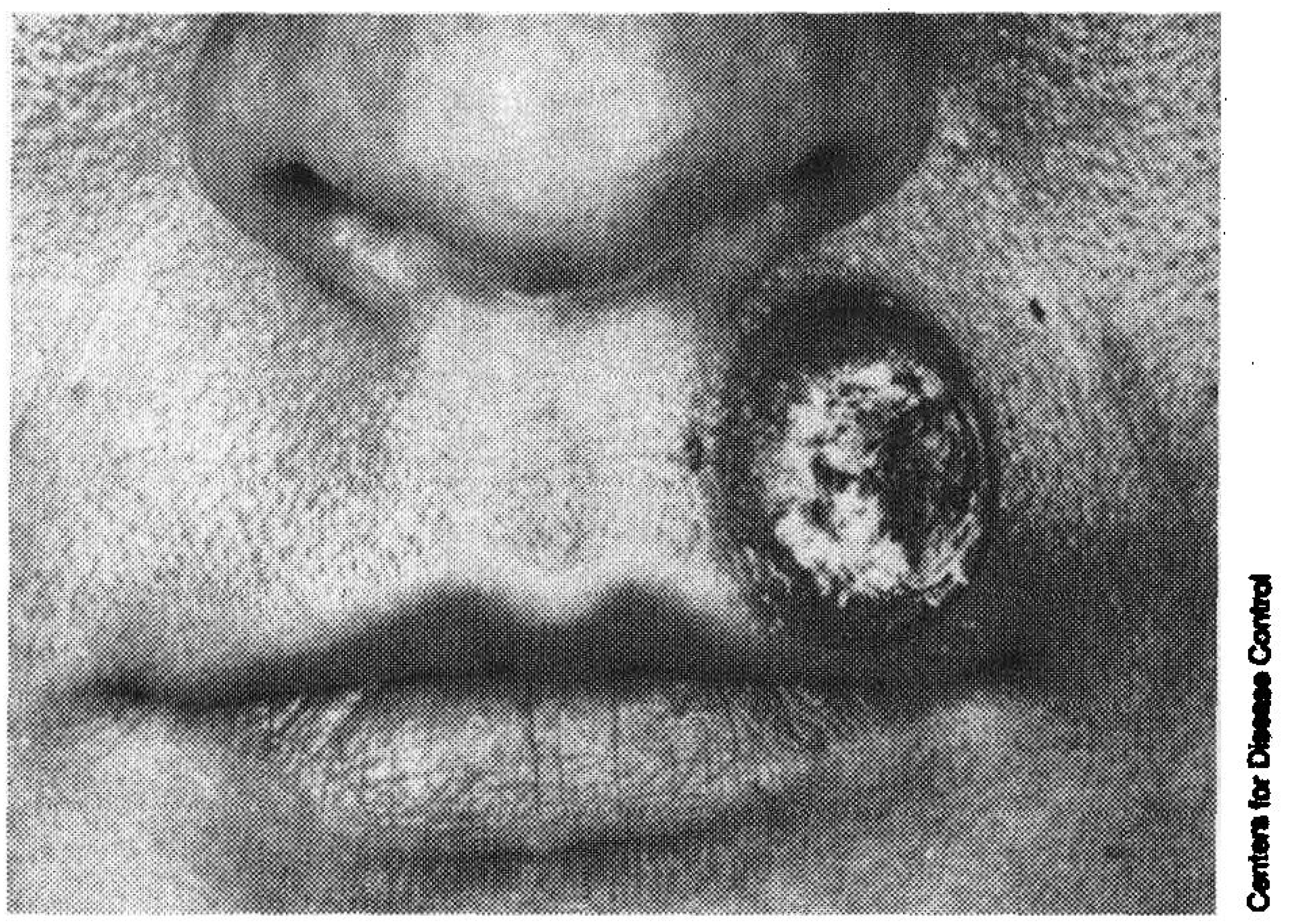
图 26.27　苍白密螺旋体。(a) 渗出液黑背景显微照片，苍白密螺旋体细胞宽 0.15μm，长 10～15μm。(b) 苍白密螺旋体细胞的投影（shadow cast）电镜照片，注意内鞭毛（endoflagella)，是螺旋体的典型特征（见 12.33 节)。

梅毒经常和淋病一起传播，但梅毒比淋病更加严重。主要由于二者在症状和病理生物学上的区别，梅毒在美国的发病率要远低于淋病（图 26.25)。

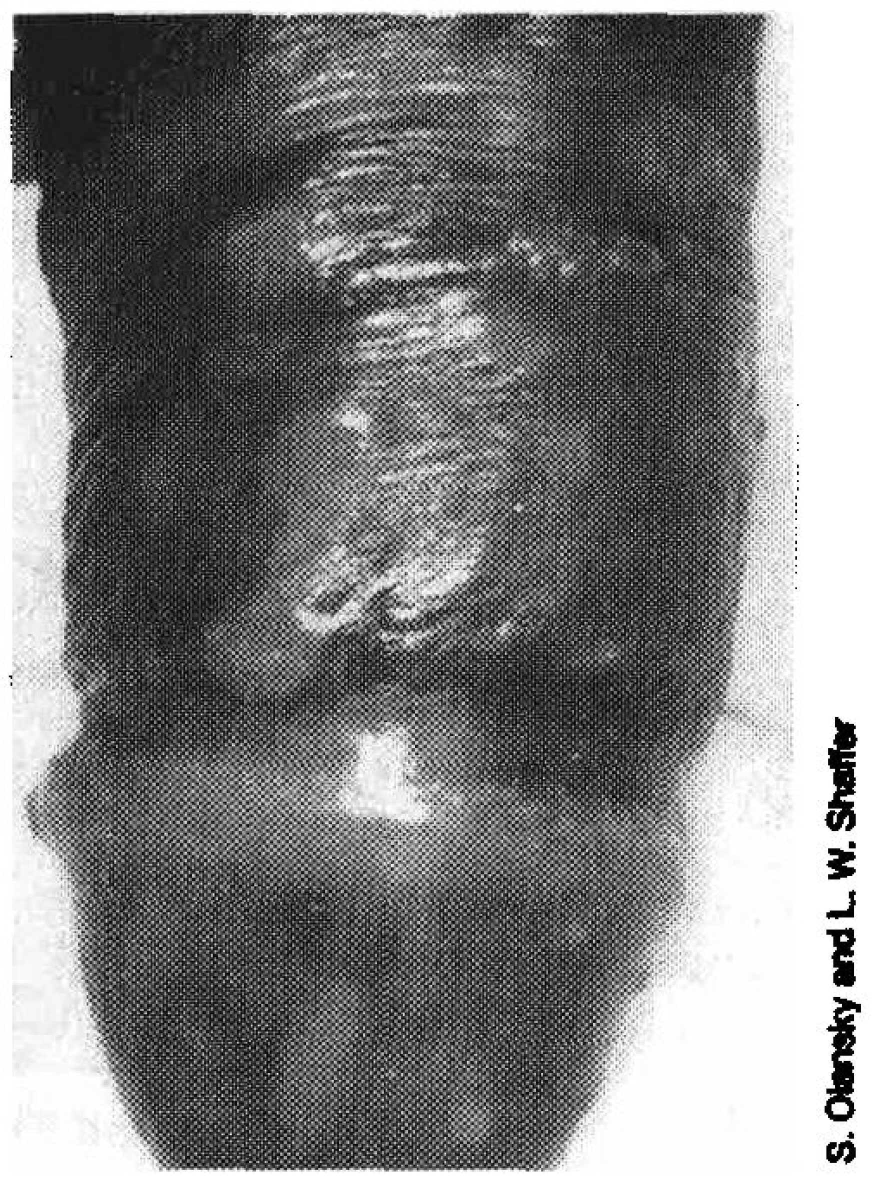
苍白密螺旋体不能穿过完好的皮肤，所以最初的感染常发生在表皮层的细小裂口处，男性的初次感染常发生在阴茎部位，而女性则发生在阴道、子宫颈和会阴处。大约 10%的病例是生殖器以外的感染，常发生在口腔颌面部（oral region)。在怀孕期间，这种病原体可以从被感染的妇女传给胎儿，通过这种方式获得的疾病称为先天性梅毒（congenital syphilis)。

梅毒是一种极端复杂的疾病，每个患者都有可能发展到三个阶段的中的任何一个，但梅毒总是从局部的感染开始，称为一期梅毒（primary syphilis)。一期梅毒中，苍白密螺旋体在进入的原始部位增殖，在两周至两个月内会形成一种特征性的一期损伤称为下疳（chancre，图 26.28)。用暗视野显微镜观察梅毒下疳渗出物可看到活跃运动的螺旋体（图 26.27a)。大部分病例中，下疳会自然愈合，而且螺旋体会在该部位消失。但是，有的细胞会从原始部位传播到身体的不同部位，如黏膜、眼睛、关节、骨骼或中枢神经系统，而且会出现扩张性的增殖。然后，常出现对苍白密螺旋体的超敏反应，表现为皮肤表面普遍出现斑疹；这种斑疹就是二期梅毒（secondary syphilis）的关键症状。在这个阶段，首先患者可能极具传染性，但最终苍白密螺旋体会从二期损伤中消失而且

传染性下降。



(a)



(b)

图 26.28　一期梅毒损伤。(a) 嘴唇上的疳。(b) 阴茎上的几个疳。疳是一期梅毒的特征性损伤，由苍白密螺旋体在感染部位造成。得了疳的患者一般会主动求医，明显的疳可加快诊断和治疗的进程。通过单独注射青霉素 G 就可以治愈梅毒（表 26.3）。在 12.33 节中介绍了密螺旋体的生物学。

如果对二期梅毒不予治疗，疾病随后的发展很为多样。有 1/4 的患者会自然痊愈（通过抗体滴度下降来证明），另一 1/4 的患者，虽然不变或升高的抗体滴度表明其仍处于持续活跃的感染，但症状不进一步发展。大约有 1/2 的患者会进入三期梅毒（tertiary syphilis），这时的症状很多样，从相对较轻的皮肤与骨骼感染一直到严重甚至致命的心血管与中枢神经系统的感染。涉及神经系统的感染可能会引起全身性的麻痹和其他严重的神经系统损伤。三期梅毒患者只有相对较少的病原体存在，大多数症状可能是由针对螺旋体的迟发型超敏反应造成的炎症所引起的（见 22.3 节和 22.15 节）。

在 24.1 节中我们介绍了梅毒的临床免疫学、微生物学和实验室诊断。一期梅毒感染的最重要的单一的身体特征——疳，也是该病的诊断依据。由于高度可见的疳，感染个体一般寻求对梅毒的治疗。

青霉素在对梅毒的治疗中十分有效，而且疾病的一期和二期阶段，通常可以通过单独注射苄星青霉素 G 加以控制。在三期梅毒时，青霉素治疗的时间必须延长。在美国，一期和二期梅毒的发病率近二十年来明显降低并且现在处于有记录以来的最低水平。

概念检查

分别由淋病奈瑟氏球菌和苍白密螺旋体引起的淋病和梅毒是性传播的感染，如果不加以治疗就会引起潜在的严重后果。虽然近年来其发病率总是在降低，在美国每年仍有超过 350 000 例的淋病和 6000 例的梅毒。

◆ 至少说出一种造成淋病比梅毒发病率高的潜在原因。

◆ 描述不加治疗的淋病和梅毒的发展进程。这两种病都能被治愈吗？

26.13 衣原体、疱疹和滴虫病

衣原体（chlamydia）、疱疹（herpes）和滴虫病（trichomoniasis）是分别由细菌、病毒和原生动物传播的重要的 STI。这些疾病在人群中非常流行，并且在诊断和治疗方面比淋病和梅毒远为困难。

衣原体

许多通过性传播的疾病都是由专性细胞内生长的砂眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）感染所引起的（见 12.27 节和图 26.29)。通过性传播的砂眼衣原体感染（一种可报告的疾病，表 25.3）的总发病率可能要大大高于淋病的发病率。每年有超过 60 万的报告病例和可能近 300 万的新的砂眼衣原体性传播感染，使这种微生物成为引起性病的最普遍原因。砂眼衣原体也能引起一种严重的眼病称为砂眼（见 12.27 节），但引起性病的菌株与引起砂眼的菌株是截然不同的。衣原体感染还可以在产道中先天性地传染给新生儿，造成新生儿结膜炎（conjunctivitis）和肺炎。

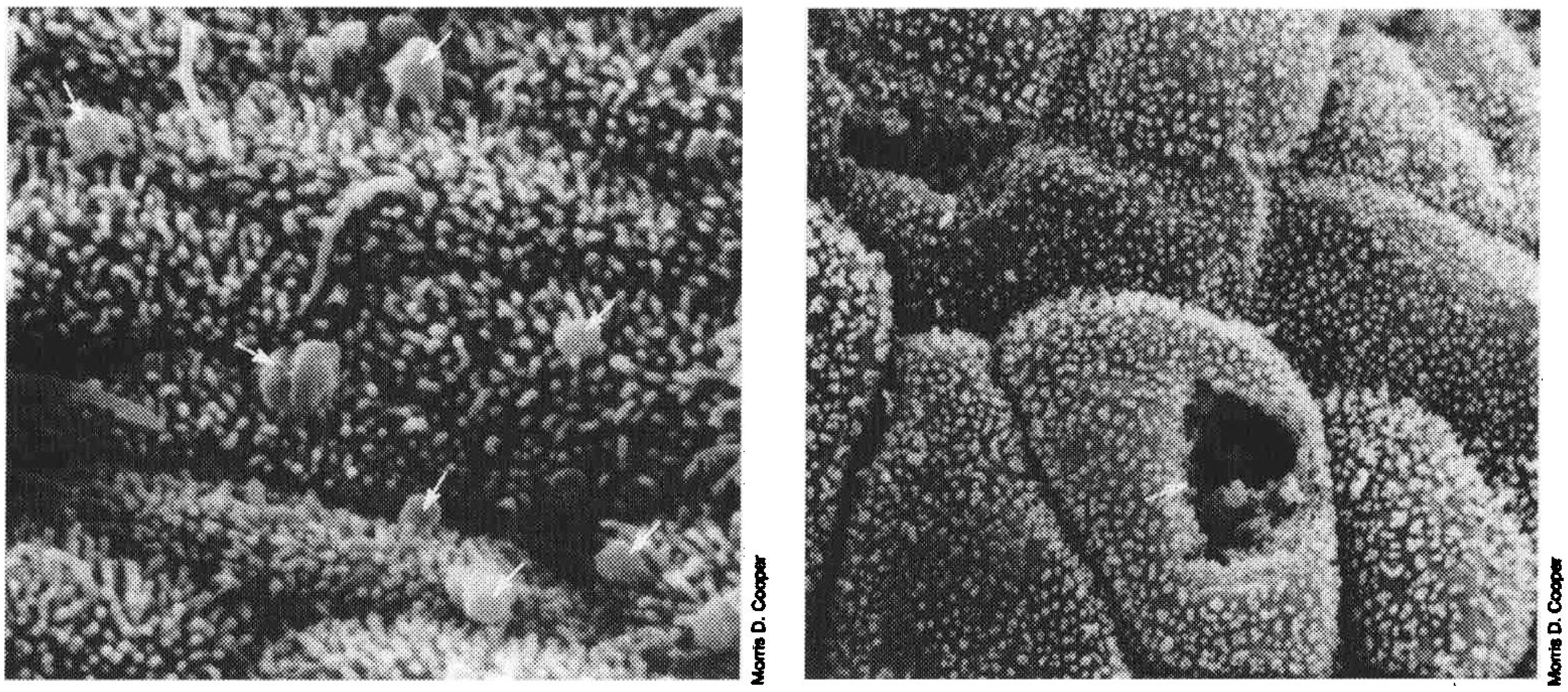


图 26.29 砂眼衣原体细胞（箭头）附着在人的输卵管组织上。（a）细胞附着在输卵管的微绒毛处。（b）损伤的输卵管，在损伤处含有一个砂眼衣原体细胞（箭头）。

衣原体造成的非淋菌性尿道炎（NGU）是在男性和女性中出现最频繁的性传播疾病之一，但感染通常是不明显的。少数情况下，衣原体 NGU 会引起严重的并发症，包括男性的睾丸肿胀和前列腺炎，以及女性的宫颈炎、盆腔炎和输卵管损伤；砂眼衣原体的细胞附着在输卵管的微绒毛上，侵入、增殖，最后裂解细胞（图 26.29)，如不加以治疗，NGU 会造成不育。

用传统的分离和鉴定方法诊断衣原体 NGU 相对困难。为了加速诊断，已发展了多种检测方法，用于从阴道或盆腔拭子或排出物中鉴定砂眼衣原体。这些临床检测包括核酸探针检测与荧光单克隆抗体及各种酶联免疫吸附试验（ELISA），用以检测特定的砂眼衣原体抗原。如果怀疑是衣原体感染，可首先使用抗生素阿奇霉素或强力霉素加以治

疗（表 26.3）。

衣原体性 NGU 常作为淋病的继发性感染出现。如果在一次感染中，淋病奈瑟氏球菌和砂眼衣原体同时传染给一个新宿主，那么用头孢克肟或头孢曲松通常可以成功地治疗淋病，但却不能清除衣原体。虽然淋病被治愈，但这样的患者仍然有衣原体感染，最终会出现表面上的淋病复发实际上是衣原体性 NGU。那么，患者在接受淋病治疗的同时也应该使用阿奇霉素或强力霉素治疗潜在的通常诊断不出的衣原体共感染。

性病淋巴肉芽肿（lymphogranuloma venereum）也是由砂眼衣原体不同的菌株引起的性传播疾病（LGV1、LGV2 或 LGV3）。这种疾病常发生在男性中，表现为腹股沟内及周围的淋巴结肿大。衣原体细胞可以从被感染的淋巴结转移到直肠，引起直肠组织的疼痛性炎症，称为直肠炎（proctitis）。由于该病可引起局部淋巴结损伤和直肠炎等并发症，因此性病淋巴肉芽肿也被认为是严重的性传播衣原体感染。这也是唯一一种侵入到上皮细胞层以外的衣原体感染，其他的衣原体（Chlamydia）都是在上皮细胞完成感染和生长的。

疱疹

疱疹病毒是一大类复杂的双链 DNA 病毒（见 16.12 节），其中很多是人类的病原体。作为疱疹病毒的一个亚类，单纯疱疹病毒（herpes simplex virus）引起冷疮（cold sores）和生殖器感染。

Ⅰ型单纯疱疹病毒（herpes simplex virus type 1，HSV-1）感染嘴和唇部周围的上皮细胞，引起冷疮（又称 fever blister）（图 26.30a），不过，HSV-1 也可能偶尔会感染包括肛门与生殖器区在内的身体其他部位。HSV-1 通过直接接触或唾液传播。HSV-1 感染的潜伏期短（3～5 天），在 2～3 周内损伤可以不治而愈。HSV-1 感染的复发相当常见，一般认为病毒主要是通过与有传染性的损伤部位直接接触传播的。由于病毒以很少的数量持续存在于神经组织中，所以潜伏的疱疹感染十分普遍。急性疱疹感染复发是由于某些不明的或不确定的原因（如共感染和压力）定期触发病毒的活性造成的。HSV-1 引起的口腔疱疹十分常见，好在除了嘴部水疱产生的不适，似乎对宿主并没有更有害的影响。

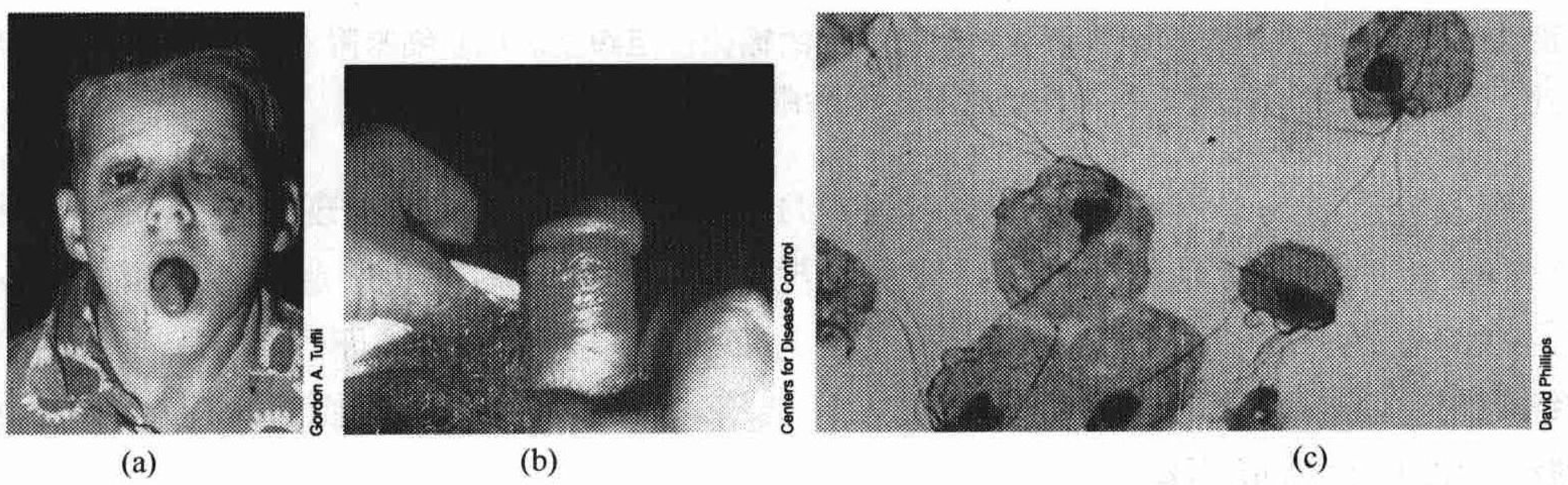


图 26.30　疱疹病毒和毛滴虫。（a）一个感染Ⅰ型单纯疱疹病毒的严重疱疹病例，脸部产生了水疱。（b）阴茎上感染Ⅱ型单纯疱疹病毒造成的生殖器疱疹。（c）生有鞭毛的原生动物阴道毛滴虫的细胞。

Ⅱ型单纯疱疹病毒（herpes simplex virus type 2，HSV-2）的感染主要与肛门和生殖器区有关，在男性的阴茎或女性宫颈、阴户及阴道处，病毒会引起疼痛的水疱（图 26.30b）。HSV-2 的感染一般通过直接性接触传播，而且在水疱活动期的传染性比在隐性感染期（可能的潜伏期）要强。HSV-2 有时也会感染身体的其他部位，比如口腔黏膜。新生儿在出生时通过与产道内疱疹损伤部位的接触可感染 HSV-2，病情可能轻微到只是没有明显损伤的潜伏感染，也可能严重到是全身性的疾病，导致大脑的损伤或死亡。为避免新生儿疱疹感染，建议感染生殖器疱疹的怀孕妇女分娩时采取剖腹产。生殖器疱疹感染的长期影响还不是完全清楚，然而，研究表明生殖器疱疹感染与女性的宫颈癌密切相关。

尽管有限的几种药物已成功地控制了传染性水疱阶段，但生殖器疱疹感染的治疗在目前还是没有办法的。口服或局部使用鸟嘌呤类似物无环鸟苷（商品名：阿昔洛韦）（图 26.31）能够特别有效地限制活性病毒从水疱的发散而且能够促进水疱损伤的愈合。无环鸟苷特异性地干扰疱疹病毒的 DNA 聚合酶，阻止病毒 DNA 的复制。

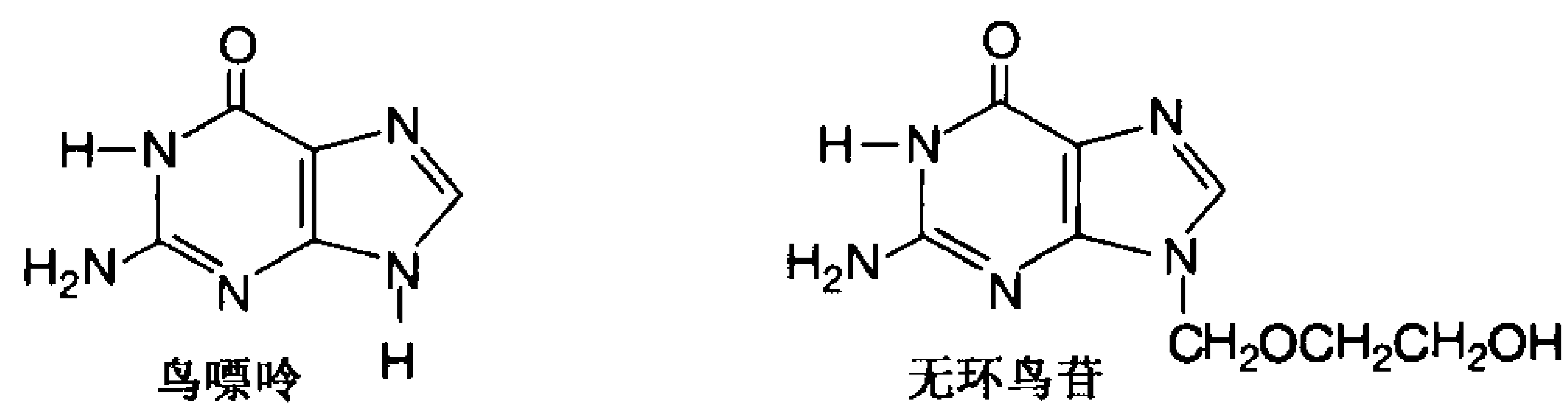


图 26.31　鸟嘌呤和鸟嘌呤类似物无环鸟苷。无环鸟苷用于治疗性控制生殖器疱疹（HSV-2）的水疱。

滴虫病

非淋菌性尿道炎也可由原生动物阴道毛滴虫（*Trichomonas vaginalis*）感染引起（图 26.30c）。在 14.2 节、14.9 节和 14.10 节已介绍过毛滴虫的生物学。阴道毛滴虫不产生对于原生动物的生命周期非常重要的休眠细胞和包囊（cyst），所以必须通过人与人之间的传播，主要是通过性交传播。不过阴道毛滴虫细胞在湿润表面可以存活 1～2h，在水中 30～40min，在尿或精液中可以存活近 24h。这样，偶尔通过污染的马桶、桑拿长椅和毛巾也会传播阴道毛滴虫。阴道毛滴虫感染妇女的阴道、男性的前列腺和精囊及男性和女性的尿道。

男性中，许多滴虫病都是毫无症状的，而女性常出现阴道分泌物、阴道炎和尿道疼痛。这种感染在女性中更为常见，而且调查表明，25%～50%性行为活跃的女性被感染，而只有大约 5%的男性患病（前列腺液有杀滴虫作用）。女性感染者的男性性伴应当进行滴虫检查，如有必要需加以治疗，这是因为滥交无症状的男性会把疾病传播给很多女性。对滴虫病的诊断主要是检查患者分泌物中的游动原生动物（图 26.30c）。抗原生动物的药物——灭滴灵可有效治疗滴虫病（表 26.3）。

概念检查

衣原体疾病是最流行的 STI，由细菌砂眼衣原体感染引起。对衣原体性非淋菌性尿

道炎不加以治疗会引起男性和女性严重的并发症。疱疹损伤也可以通过性传播，由Ⅰ型单纯疱疹病毒和Ⅱ型单纯疱疹病毒引起。HSV-2 通常与性传播和肛门、生殖器区的感染有关。阴道毛滴虫是引起另一种 STI——滴虫病的一种原生动物。总的来说，这些 STI 传播广泛并且诊断和治疗比淋病和梅毒更为困难。现今还没有治愈疱疹的方法。

◆ 描述衣原体疾病、疱疹和滴虫病的相关临床特征和治疗方案。

◆ 为何这些疾病比淋病或梅毒更难诊断?

26.14 获得性免疫缺陷综合征：AIDS 和 HIV

1981 年，获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome，AIDS）被确认为是一种独特的疾病。从那以后仅在美国就有超过 90 万的 AIDS 报告病例，而且有 50 多万人死亡（见 25.6 节）。在美国，超过 140 万人感染了 HIV，大约 100 万人正经受着 AIDS 的折磨。从全球来看，局面更加严重，已有超过 5000 万人感染了人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV），是 AIDS 的致病原因，超过 1600 万人已经死于 AIDS。

HIV 分为两种主要类型，HIV-1 和 HIV-2。HIV-1 与 HIV-2 遗传学上相似，但两者截然不同。1985 年，HIV-2 在西非被发现，与 HIV-1 相比毒力减弱，引起较轻的类 AIDS 病。目前，全世界超过 99%的 AIDS 病例是由 HIV-1 引起的，我们将重点介绍 HIV-1 的感染。

AIDS 是由人类免疫缺陷病毒（HIV-1）引起的，HIV-1 是一种反转录病毒（见 16.15 节）。两个相同的单链 RNA 基因组中均含有 9749 个核苷酸。完整病毒内的反转录酶（reverse transcriptase）以 RNA 为模板催化合成互补的单链 DNA 分子，然后把互补的 DNA（cDNA）分子转变为双链 DNA 分子，后者可以整合进入宿主细胞的基因组中。

如果研究不出有效的治疗方法或预防措施，HIV 感染患者的数量还将继续增多。在美国，新诊断出的 HIV 感染一直在增加，由抗反转录病毒的组合治疗一度造成的 HIV 发病率和致死率下降的趋势已经停止，AIDS 流行性和严重度从 20 世纪 90 年代以来下降的趋势也被反转。我们已经介绍了 AIDS 的流行病学（见 25.6 节）和鉴定与跟踪 HIV 感染的临床诊断方法（见 24.10～24.11 节）。在这节中，我们将重点介绍 AIDS 的发病机制，主要涉及 HIV 感染的固有过程和 HIV 对免疫系统的影响。

AIDS 的定义

AIDS 首先被怀疑是一种影响免疫系统的疾病，这是由于在某些人群中发现了大量的机会感染（opportunistic infection）（见 25.6 节）。机会感染通常仅见于免疫系统功能异常的个体。1993 年美国佐治亚州亚特兰大疾病控制与预防中心采用了以下定义，用于美国国内定义 AIDS。

通用的 AIDS 定义包括①HIV 检测阳性并且②符合下列两个标准中的一个。

1. 患者全血 CD4 T 细胞数量小于 200 个/mm^3（正常情况 600～1000 个/mm^3）或 CD4 T 细胞占总淋巴细胞的百分比小于 14%。

2. 虽然患者的CD4 T细胞数量可能大于200个/mm^3，但是有如下任一种病情：真菌性疾病包括念珠菌病（图 26.32a），球胞子菌病（coccidiomycosis），隐球菌病（cryptococcosis，图 26.32b），组织胞浆菌病（histoplasmosis，图 26.32c），等孢子虫病（isosporiasis），卡氏肺囊虫性肺炎（*Pneumocystis carinii* Pneumonia，图 26.32d），隐孢子虫病（cryptosporidiosis，图 26.32e）或脑部的刚地弓形虫病（toxoplasmosis，图 26.32f）；细菌性疾病包括肺结核或其他的分枝杆菌属感染（图 26.32g）或复发性的沙门氏菌败血病（*Salmonella* septicemia）；病毒性疾病包括细胞巨化病毒（cytomegalovirus）感染，HIV 相关的脑病（HIV-related encephalopathy），HIV 消耗性综合征（HIV wasting syndrome），慢性溃疡或单纯疱疹病毒引起的支气管炎（见 16.12 节）；愈来愈严重的进行性多灶性白质脑病（progressive multifocal leukoencephalopathy），恶性疾病如扩散性子宫颈癌、卡波济肉瘤（Kaposi's sarcoma，图 26.33）、伯基特淋巴瘤（Burkitt's lymphoma）、原发性脑淋巴瘤（primary lymphoma of the brain），或免疫母细胞性淋巴瘤（immunoblastic lymphoma）；任何因素造成的复发性的肺炎。

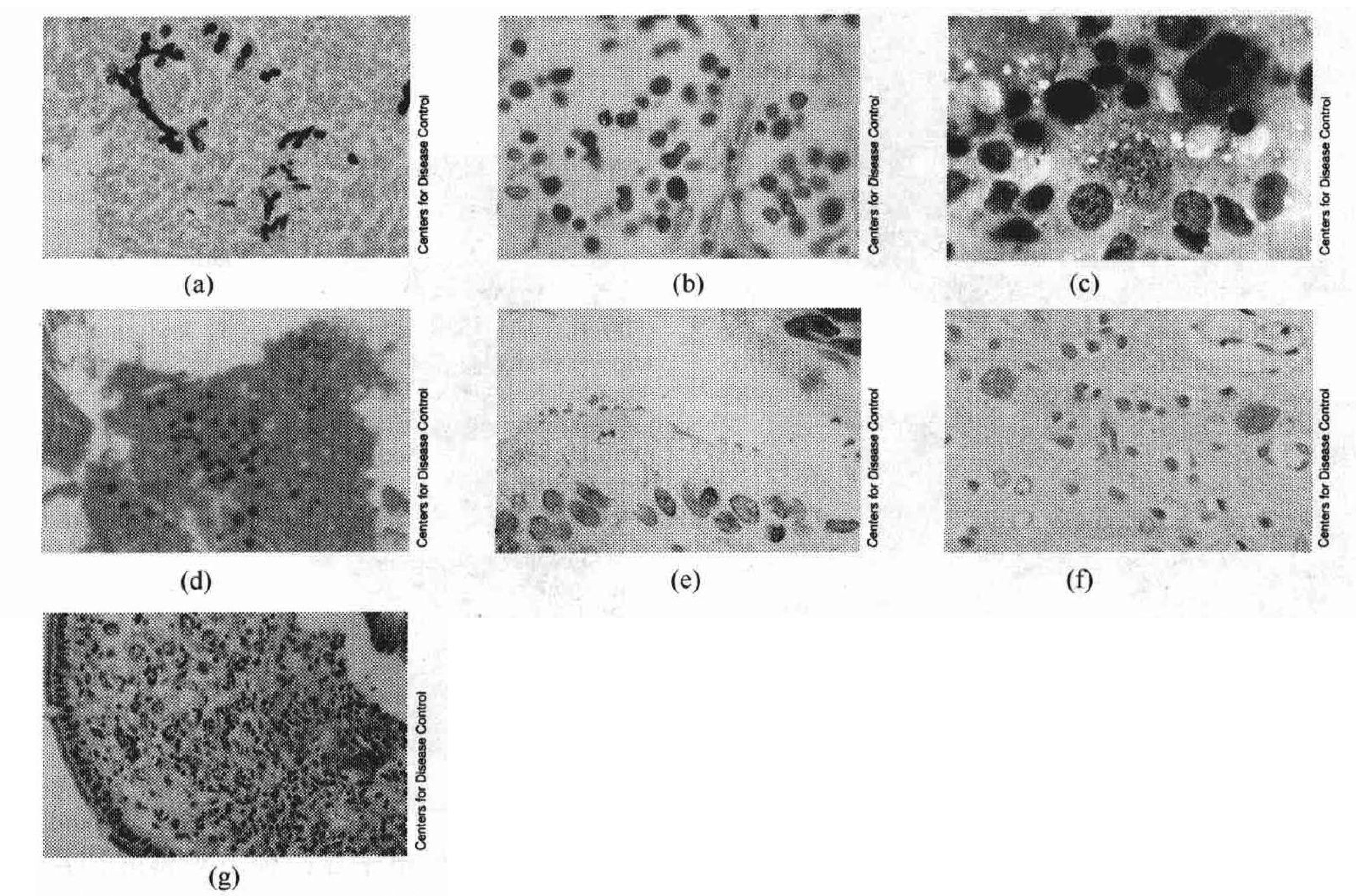


图 26.32　与 AIDS 有关的条件病原体。(a) 白假丝酵母（*Candida albicans*），来自全身性念珠菌感染患者的心脏组织。(b) 新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*），来自隐球菌病患者的肝脏组织。(c) 荚膜组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*），来自组织胞浆菌病患者的肝脏组织。(d) 卡氏肺囊虫（*Pneumocystis carinii*），来自肺孢子虫病（pulmonary pneumocytosis）患者。(e) 隐孢子虫（*Cryptosporidium* sp.），来自隐孢子虫病患者的小肠。(f) 刚地弓形虫（*Toxoplasma gondii*），来自刚地弓形虫病患者的脑组织。(g) 小肠分枝杆菌属感染，抗酸染色。

AIDS 患者最常见的机会感染是原生动物卡氏肺囊虫性肺炎。AIDS 患者最常见的非细菌性（non-microbial）疾病是卡波济肉瘤——一种在男性同性恋 HIV 感染者中高

发的非典型癌症。卡波济肉瘤是血管壁细胞的一种癌症，可以辨认的特征是在皮肤（尤其是四肢皮肤）的表面形成紫色斑块（图 26.33）。卡波济肉瘤是由 HIV 和人疱疹病毒 8（HHV-8）共感染引起的，在 ADIS 患者中的流行性是正常人群中的 2 万倍。

总之，如果一个人①HIV 或 HIV 抗体检测阳性；②辅助性 T 淋巴细胞数量剧烈下降；③有众多机会感染或非典型癌症中的至少一种情况，那么他或她就是 AIDS 患者。

HIV 发病机制

HIV 能够感染带有 CD4 细胞表面蛋白的细胞。被感染的最常见的两类细胞是巨噬细胞和辅助性 T 细胞（T_H），这两种细胞都是免疫系统的重要成分（见 22.1 节和 22.8 节）。感染的巨噬细胞和 T 细胞产生并释放大量的 HIV 颗粒，这些颗粒又继续感染其他的带 CD4 的细胞（图 26.34）。

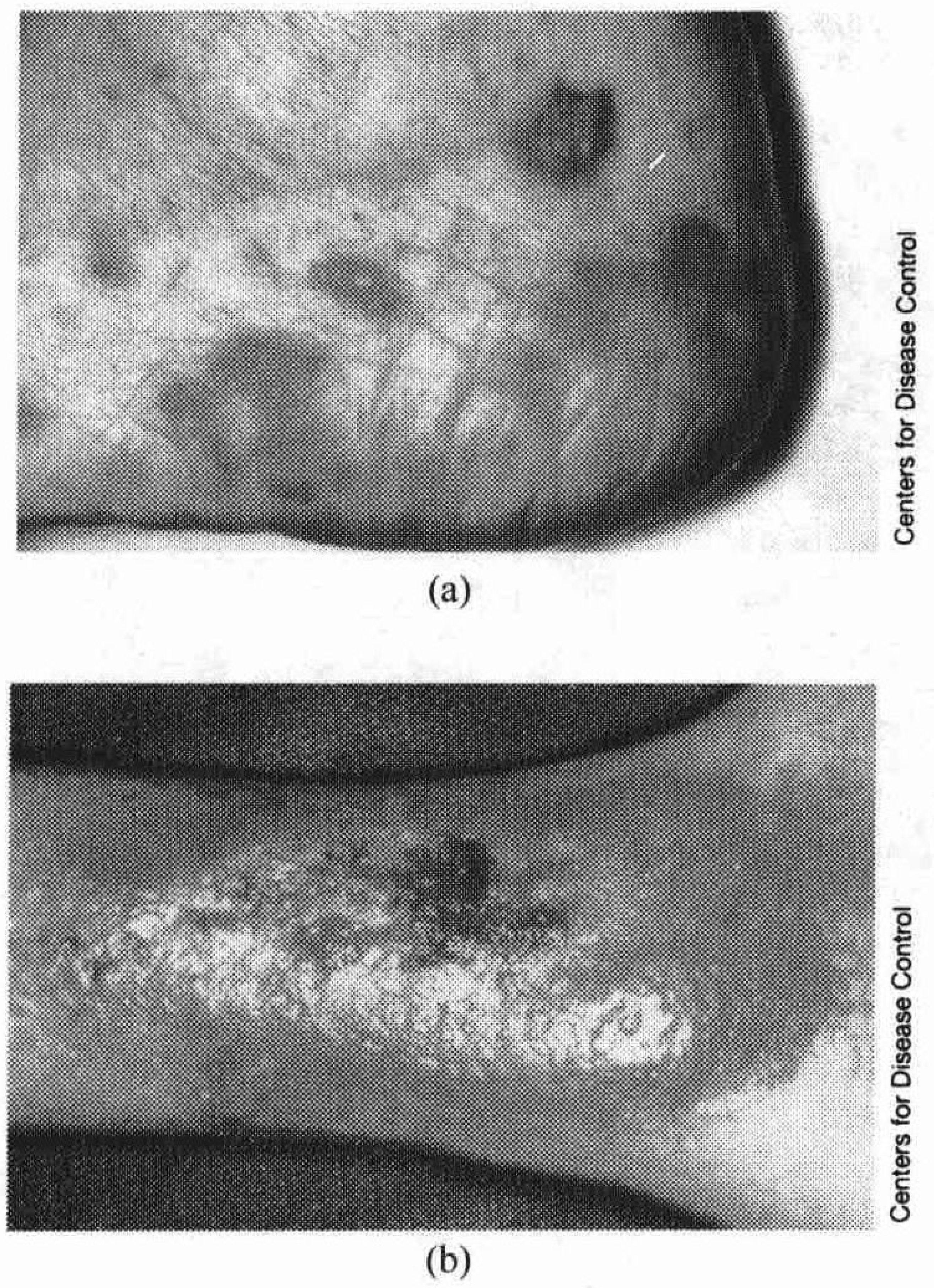


图 26.33 卡波济肉瘤。（a）脚踵和足侧与（b）小腿下段和踝出现的损伤。

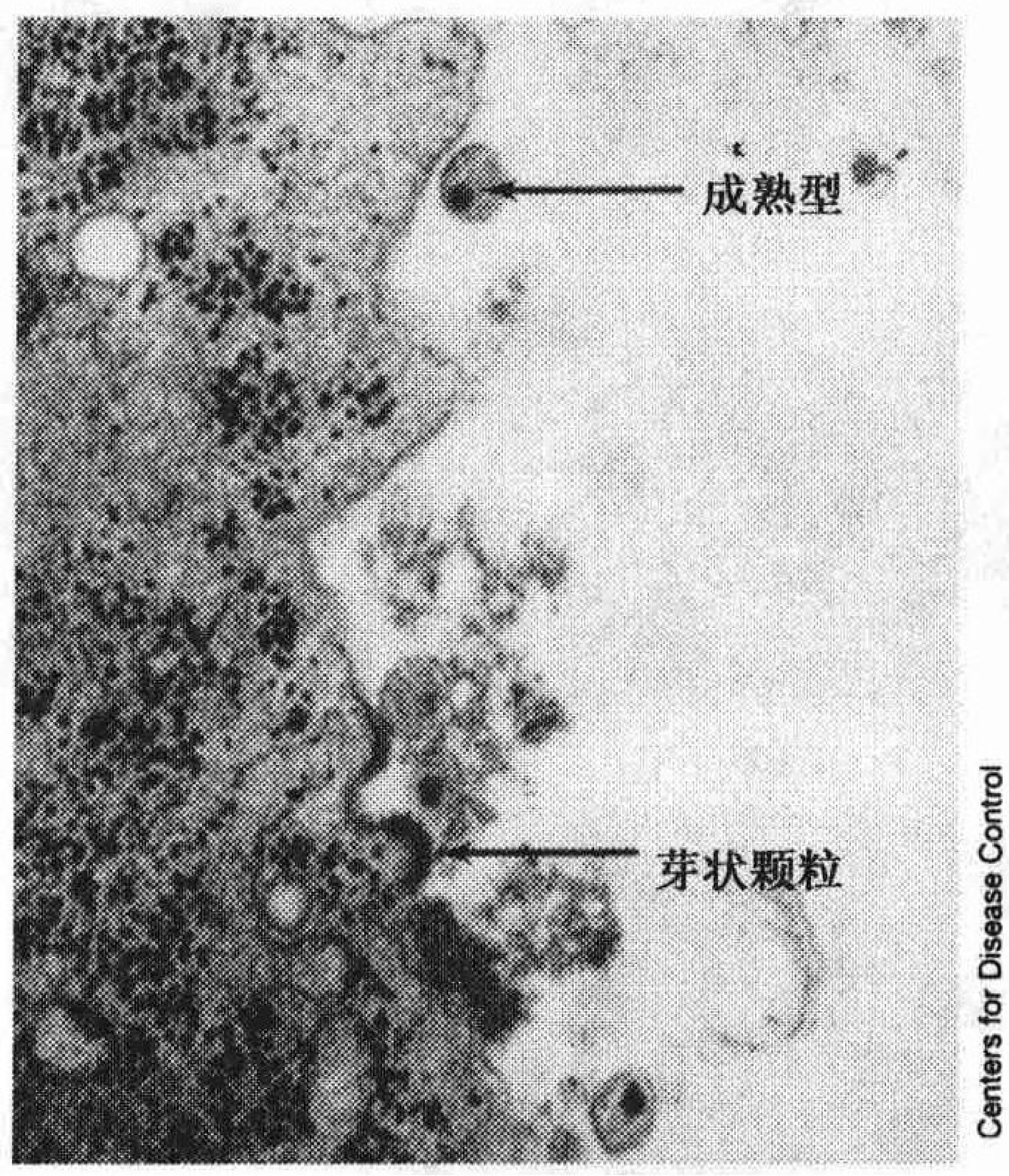
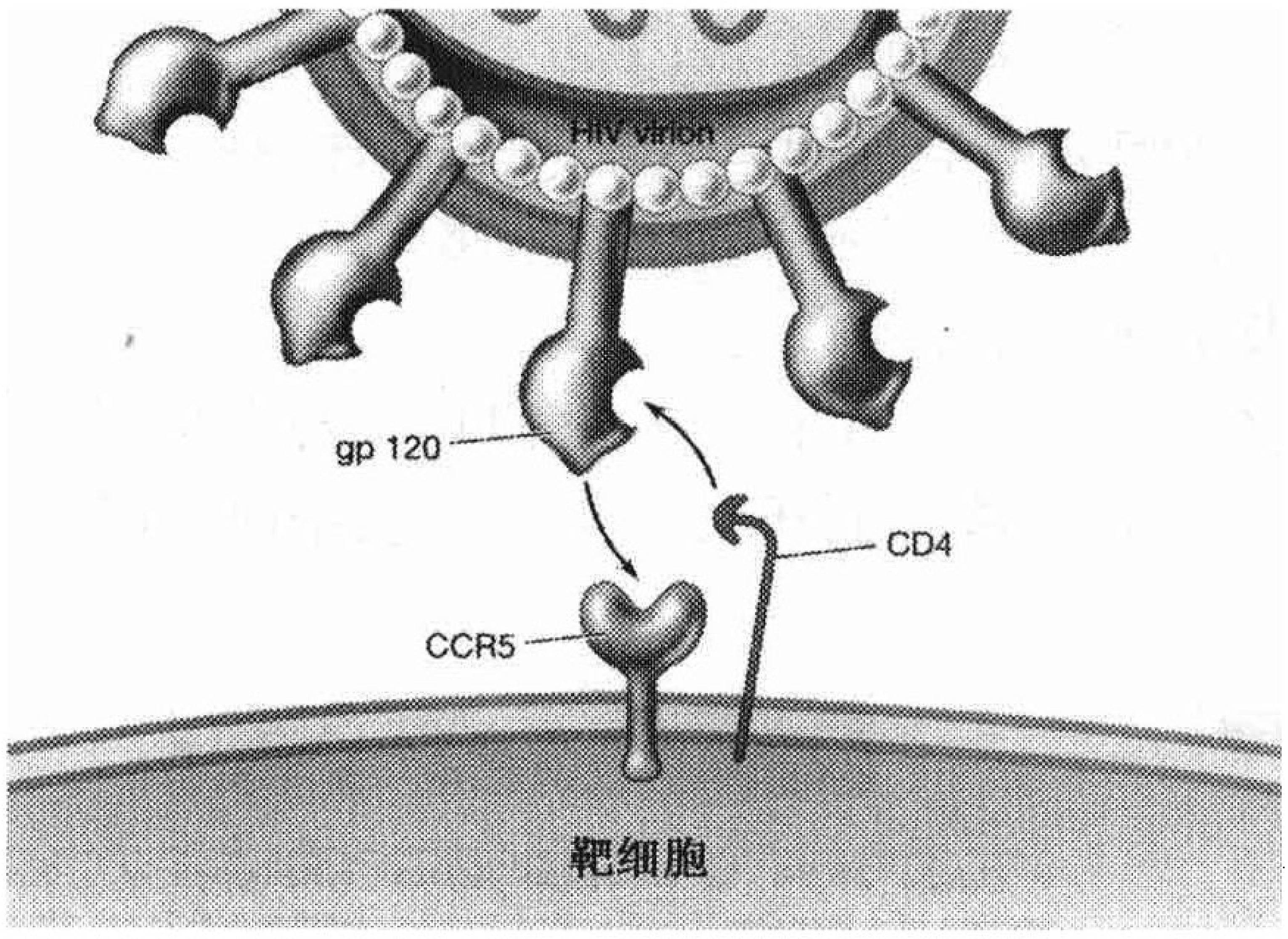


图 26.34 透射电子显微镜下观察薄切片，淋巴细胞正在释放 HIV 病毒。细胞来自患 AIDS 的血友病患者。HIV 颗粒直径为 90～120nm。与图 9.25 比较。

除了 CD4，HIV 还必须与靶细胞上的辅助受体（coreceptor）相互作用。正常情况下，HIV 感染首先发生于巨噬细胞，巨噬细胞是一种抗原呈递细胞（antigen presenting cell，APC），表面只有很低水平的 CD4（图 26.35）。在细胞表面，巨噬细胞 CD4 分子与 HIV 的 gp120 蛋白结合。病毒的 gp120 蛋白随后作用于巨噬细胞的另一个蛋白质——跨膜趋化因子受体 CCR5（见 23.11 节）。CCR5 是 HIV 的辅助受体，与 CD4 共同形成停靠点（docking site），在此 HIV 包膜（envelope）与宿主细胞膜融合；融合使

得病毒的核衣壳（nucleocapsid）插入细胞。CCR5 辅助受体是 HIV 与巨噬细胞结合所必需的。表达变异的 CCR5 蛋白的个体不能结合 HIV 也不会获得 HIV 感染。当 HIV 感染巨噬细胞 APC 后，就会产生不同形式的 gp120 蛋白，新 gp120 蛋白又能与 T 细胞的辅助受体——CXCR4 趋化因子受体结合。



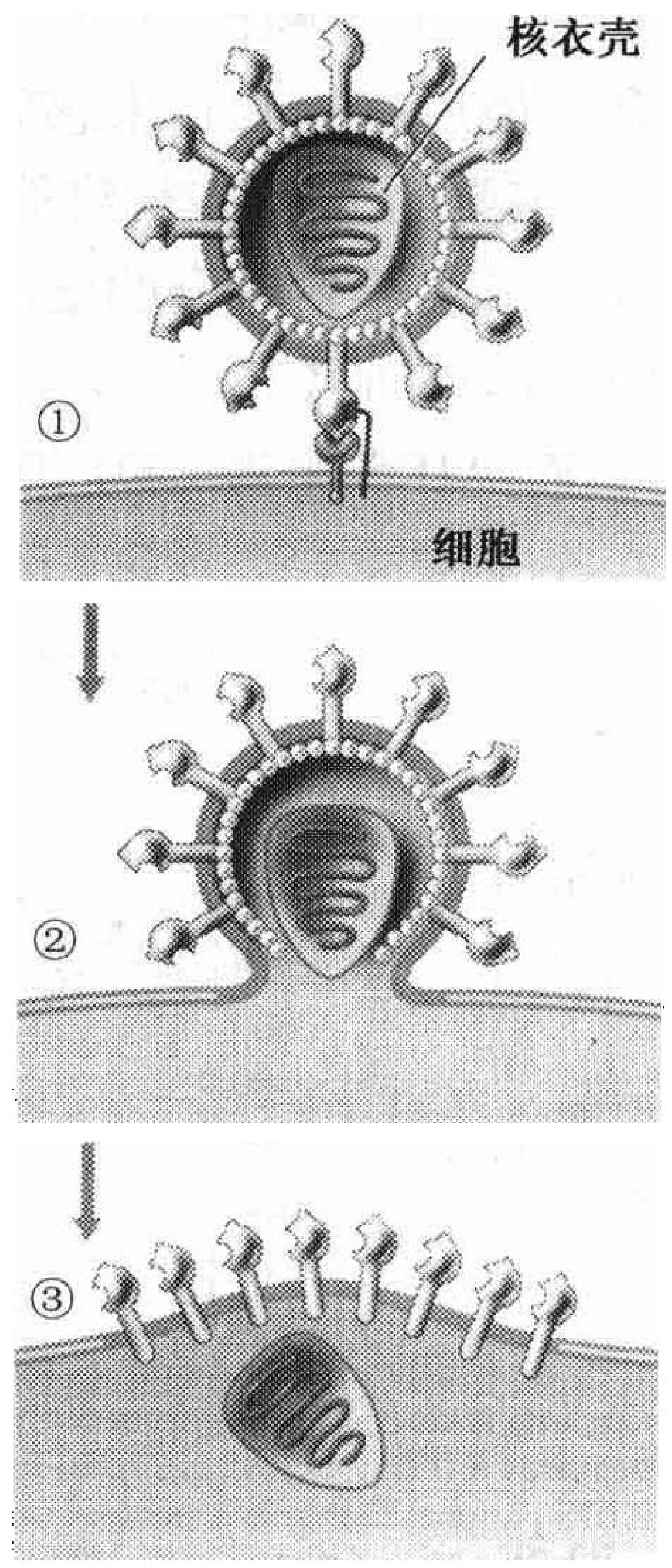


图 26.35　HIV 感染 CD4 靶细胞。（a）通过 HIV gp120 蛋白与靶细胞（如巨噬细胞或 T 细胞）CD4 受体和一个辅助受体的特异性结合，HIV 和靶细胞相互作用。所示辅助受体是巨噬细胞上的跨膜趋化因子受体 CCR5，在 CD4 T 细胞上，类似的受体是 CXCR4。（b）HIV 包膜与宿主细胞融合：①病毒与宿主细胞上的受体/辅助受体对相互作用，缺乏受体或辅助受体的细胞不能结合 HIV 也不会被感染。②与细胞表面结合后，病毒包膜和宿主的细胞膜接合。③最终，病毒的核衣壳插入宿主细胞，开始活性病毒感染。反转录病毒（如 HIV）的生物学和复制过程详见 9.13 节和 16.15 节及图 9.25、图 9.26、图 16.25 和图 16.26。

然后，HIV 进入并破坏 CD4 辅助性 T 淋巴细胞，包括 T_H 1 和 T_H 2 细胞，它们分别负责细胞介导的炎症反应和辅助 B 细胞（见 22.8 节）。这样，HIV 感染始于巨噬细胞的感染，发展为 T 细胞的感染。最终导致巨噬细胞和 T 细胞全面的破坏，造成免疫系统灾难性的崩溃。这部分关于 HIV 感染巨噬细胞和 T 细胞时借助辅助受体的相关知识可以用来设计 HIV 特异性趋化因子受体阻断药物，阻止 HIV 对巨噬细胞或 T 细胞的附着，从而避免感染。

AIDS 患者 CD4 淋巴细胞数量大量下降，但是，HIV 感染并不立刻杀死宿主细胞。从 RNA 基因组反转录出 DNA 后，HIV 能够不以感染性的毒粒（virin）形式存在，而以前病毒（provirus）形式存在。HIV 基因组反转录产物 cDNA 整合进宿主染色体

DNA，细胞可能无外在感染迹象，HIV DNA 能够长期处于这种潜伏状态，与宿主 DNA 共同复制。到最后，病毒合成开始，新的 HIV 颗粒从细胞产生并释放。产生 HIV 的 T 细胞不再分裂并最终死亡。

HIV 的抗原被感染的 T 细胞加工后，加速了对 CD4 细胞的破坏。这些 T 细胞的表面包埋着来自 HIV 颗粒的 gp120 分子，包埋的 gp120 蛋白会与未感染的 T 细胞的 CD4 分子结合，最后感染的和未感染的细胞融合成多核的巨大细胞称为合胞体（syncytia）。一个 HIV 感染的 T 细胞最终能够结合并融合多达将近 50 个未感染的 T 细胞，合胞体一旦形成，就会导致融合的细胞失去免疫能力并死亡。

HIV 感染造成 CD4 细胞数量进行性下降。一个正常人的 CD4 细胞占总 T 细胞的大约 70%；而 AIDS 患者 CD4 细胞数量持续下降，到机会感染开始发生时，CD4 细胞几乎已不存在（图 24.22 和图 26.36）。

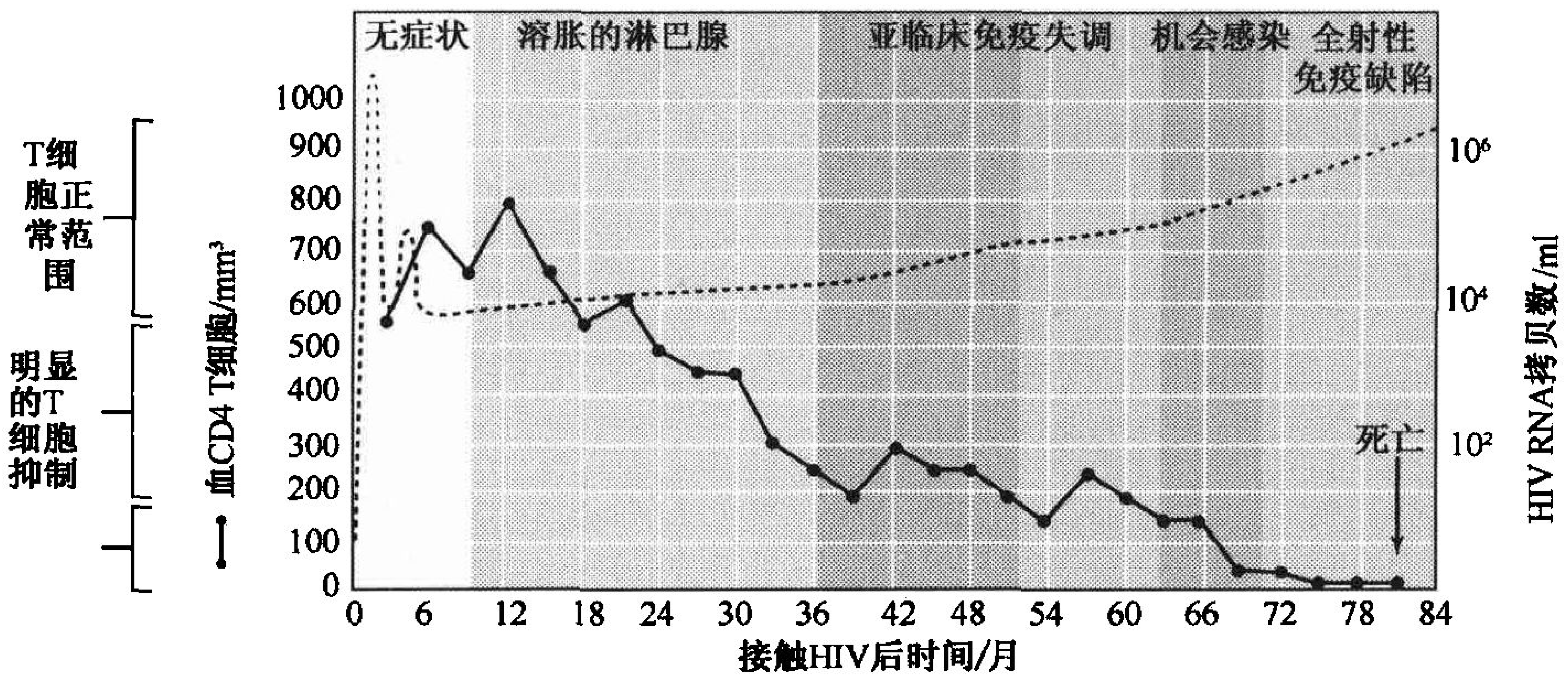


图 26.36 CD4 T 淋巴细胞的下降趋势与 HIV 感染的发展。未经治疗 AIDS 的典型发展进程中，CD4 T 细胞的数量和功能逐渐丧失，同时，以每毫升血中 HIV 特异性 RNA 拷贝数衡量的病毒量，在经历了初期的下降之后，逐渐上升。

AIDS 患者 CD4 细胞急剧减少产生严重的健康后果。CD4 细胞数量下降的同时，细胞因子的产生也随之减少，这就导致未感染的 T 细胞和其他所有类型的淋巴细胞逐渐减少。在这一过程中，AIDS 患者的体液免疫和细胞免疫系统都被严重破坏。T_H1 细胞免疫（见 22.8 节）的缺失导致全身性的真菌和分枝杆菌感染（图 26.30）。刺激 B 细胞产生抗体的 T_H2 细胞（见 22.8 节）的缺失导致抗体减少，从而造成 AIDS 患者病毒性或细菌性的机会感染。

未经治疗的 HIV 感染发展为 AIDS 的进程有一定规律。在临床的潜伏期，一个活跃的感染过程正在进行。首先，产生了对 HIV 的强烈免疫反应，每天大约有 10 亿病毒被消灭，HIV 的数量下降。然而，这也意味着 HIV 在以很高的速度复制，相应地，这种复制导致每天大约有 1 亿个 CD4 T 细胞死亡。最后，免疫反应被彻底征服，T 细胞被完全消灭，免疫系统被削弱，机会感染发生。图 26.36 展示了在未经治疗的 HIV 感染发展为 AIDS 的整个典型时间进程中 T 细胞的破坏和 HIV 病毒的增多。

诊断

可以用免疫学方法检测 HIV，放射免疫法（RIA）和酶联免疫吸附法（ELISA，

见 24.10 节）都可以用于筛选血样检出抗 HIV 抗体。ELISA 法已被证明在大规模检测供血以防止与输血相关的 HIV 方面尤其有价值。统计表明美国志愿供血者提供的全部血液的约 0.25%（每千个中有 2～3 个）被 ELISA 法查出 HIV 阳性。HIV-ELISA 阳性必须通过免疫印迹法（Western blot）进行确认，这是一种把蛋白质纯化分析手段和免疫学相结合的技术（见 24.11 节）。

还有一些快速检测方法已投入市场用于确定个体是否被 HIV 感染。其中一种方法只用患者的一滴血和一种试剂。这种试剂是一种生物工程抗体，它有一个红细胞抗原的结合位点，另一个位点结合 gp41 HIV 表面抗原。在阳性结果中，双功能的抗体把红细胞和 HIV 桥联起来，形成肉眼可见的凝集（见 24.8 节）。另一种方法是用唾液作为分泌抗体的来源，把唾液放在固定有 HIV 抗原的软片上，然后加入能与抗体结合并连有酶的二抗。当加入酶的底物后，阳性反应就会产生具有颜色的产物，类似 ELISA 法（见 24.10 节）。快速检测的目的是提供最方便、快速（只用几分钟代替使用 ELISA 法或免疫印迹的几个小时或数天）、货架期长、便于携带及易于使用和领会的检测。尽管这样，总的来说，快速检测法并没有标准的 HIV-ELISA 和 HIV-免疫印迹法灵敏或准确（见 24.10 节和 24.11 节）。

所有的方法，无论多灵敏或准确，都不能检测出那些刚刚获得病毒还未产生可检测的抗体反应的 HIV-阳性个体，在接触 HIV 以后，这一时期可能超过 6 周。这些方法尽管有一定的不足，但保证了供血的总体安全性，而且统计表明，通过接触污染的血液或血液制品而感染 HIV 的风险很低。目前，性滥交和群体使用静脉注射药物是防治 HIV 感染的主要途径（图 25.8）。

血液中是否存在 HIV 抗体常用于指示 HIV 的接触或感染（见 24.10 节和 24.11 节）。另外，已开发出一些基于病毒特异性反转录酶-聚合酶链反应（RT-PCR）的实验室检测方法（见 18.5 节）。这些检测从血样中直接定量鉴定 HIV RNA（见 24.12 节）。通过 RT-PCR 估算血液中存在的病毒数量，或称病毒量（viral load）。RT-PCR 表明了 HIV 复制的数量和相应的 CD4 T 细胞破坏的速率。CD4 检测表明 HIV 诱导的免疫损伤的程度，是免疫系统破坏程度的直接指标。由于价格昂贵和技术要求高，RT-PCR 不用于常规筛选 HIV。不过当发现感染后，可将 RT-PCR 用于监测 AIDS 的发展和化学治疗的效果（图 26.37）。

未经治疗的 HIV 感染个体的预后很差。条件病原体或恶性肿瘤（图 26.32 和图 26.33）最终会使大多数 AIDS 患者致死。对 AIDS 患者的长期研究表明，一般人感染 HIV 后需要经过几个免疫功能下降的阶段。在 5～7 年内，血液中 CD4 细胞从正常的 600～1000 个/mm^3降至接近零（图 26.36）。尽管不同患者免疫功能下降速率不同，但是如果不进行化学治疗的话，罕有 HIV 感染个体的存活超过 10 年。

治疗

有几种药物已被证明可以延缓 AIDS 的症状和明显延长 HIV 感染者的生命（表 26.4）。治疗的目标是降低 HIV 感染者的病毒量到可检测水平以下，实现这一目标的方法称为高效抗反转录病毒治疗（highly active antiretroviral therapy，HAART），通过同时使用两种或更多种的抗反转录病毒药物以抑制药物抗性的产生。通过药物治疗还不

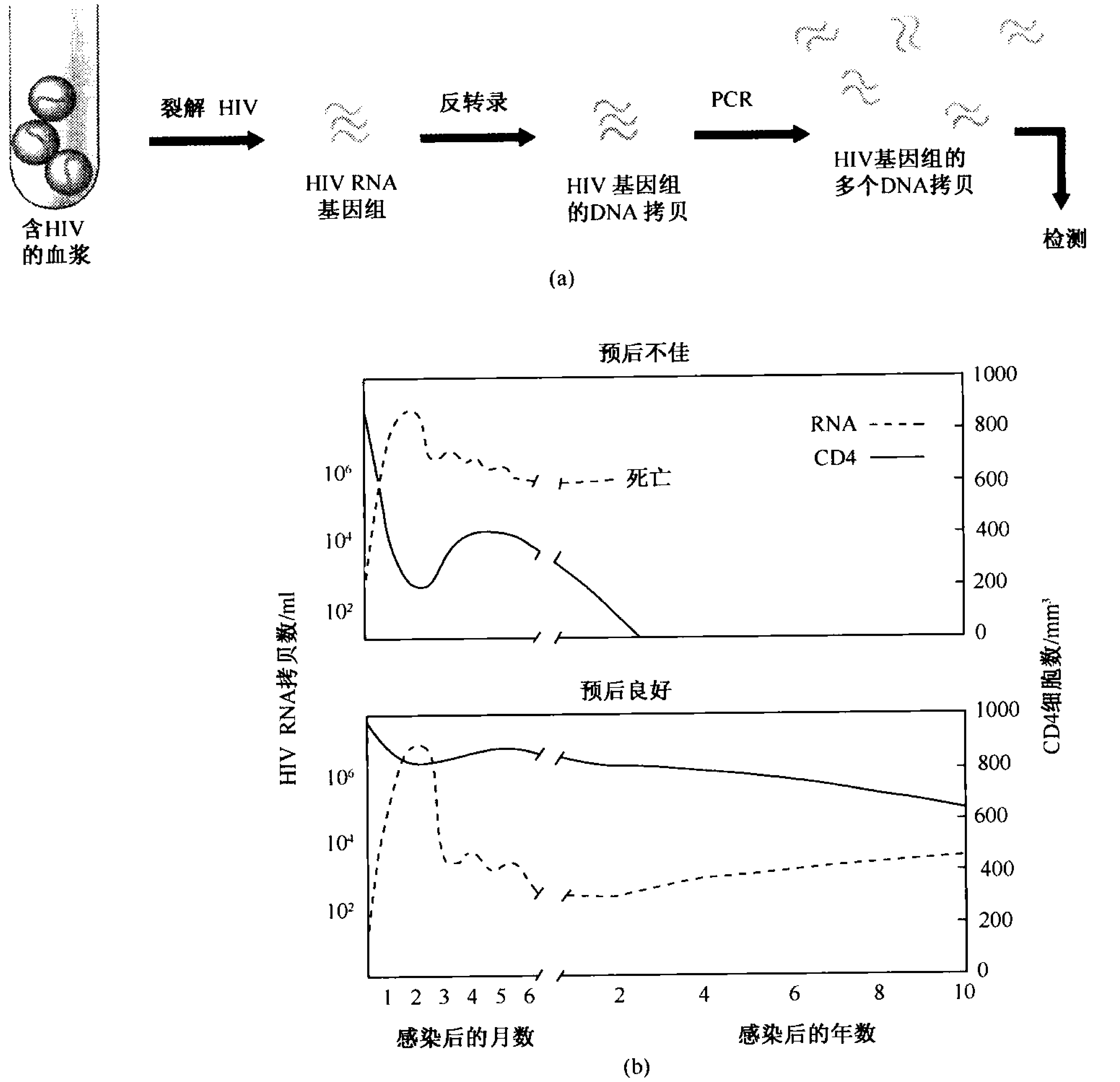


图 26.37 病毒量的监测。（a）用 RT-PCR 检测 HIV。通过在同一个 PCR 扩增中定量地与对照模板 DNA 的拷贝数进行比较，来获得 HIV 的拷贝数。病毒量表示为每毫升患者血浆中 HIV 的拷贝数目。反转录和 PCR 技术，分别详见 16.15 节和 7.9 节。（b）RT-PCR 检测的 HIV 感染的时间进程。在感染后通过连续的测定病毒量来推测感染的进程。CD4 T 细胞数以微升中的细胞数目来衡量（图 24.22）。图上半部分，远高于 10^4 个/ml 拷贝数的病毒量对应低于正常的 CD4 细胞数（正常 600～1000 个/mm^3），表明患者预后不佳，较早死亡。图下半部分，病毒量低于 10^4 个/ml 拷贝数对应正常的 CD4 细胞数，表明患者预后良好，生命延长。此检测用于监测 HIV 的感染过程，特别适用于监看药物治疗方案的功效。数据从美国佐治亚州亚特兰大疾病控制与预防中心获得。

能治愈 HIV 患者，甚至那些药物治疗后已经检测不到病毒的患者，一旦 HAART 治疗中断或停止或者多重药物抗性产生，明显的病毒量又会恢复。

有效的抗 HIV 药物分 4 大类。第一类是核苷类似物（nucleoside analog），它们是反转录酶抑制剂。反转录酶是将单链 RNA 遗传信息转换为互补 DNA 的酶（见 16.15 节）。最老的抗 HIV 药物叠氮胸苷（azidothymidine，AZT）是一种能抑制 HIV 复制的有效抑制剂。它很类似于胸腺嘧啶核苷，但在核酸链复制时缺乏与下一个碱基正确结合

的位点，导致 DNA 链合成的终止。这样，AZT 和其他的核苷类似物就称为核苷反转录酶抑制剂（nucleoside reverse transcriptase inhibitor，NRTI），阻止 HIV 的复制（图 26.38a 和表 26.4）。当 HIV 感染者使用这类药物后，病毒量会快速降低。但是几星期内，通过突变和选择，抗药性的 HIV 株就会在每个患者中出现。虽然这个过程看起来很快，但是 HIV 复制极快（见前）而且只需少至 4 个的单核苷突变就可对一个给定的核苷类似物产生抗性。

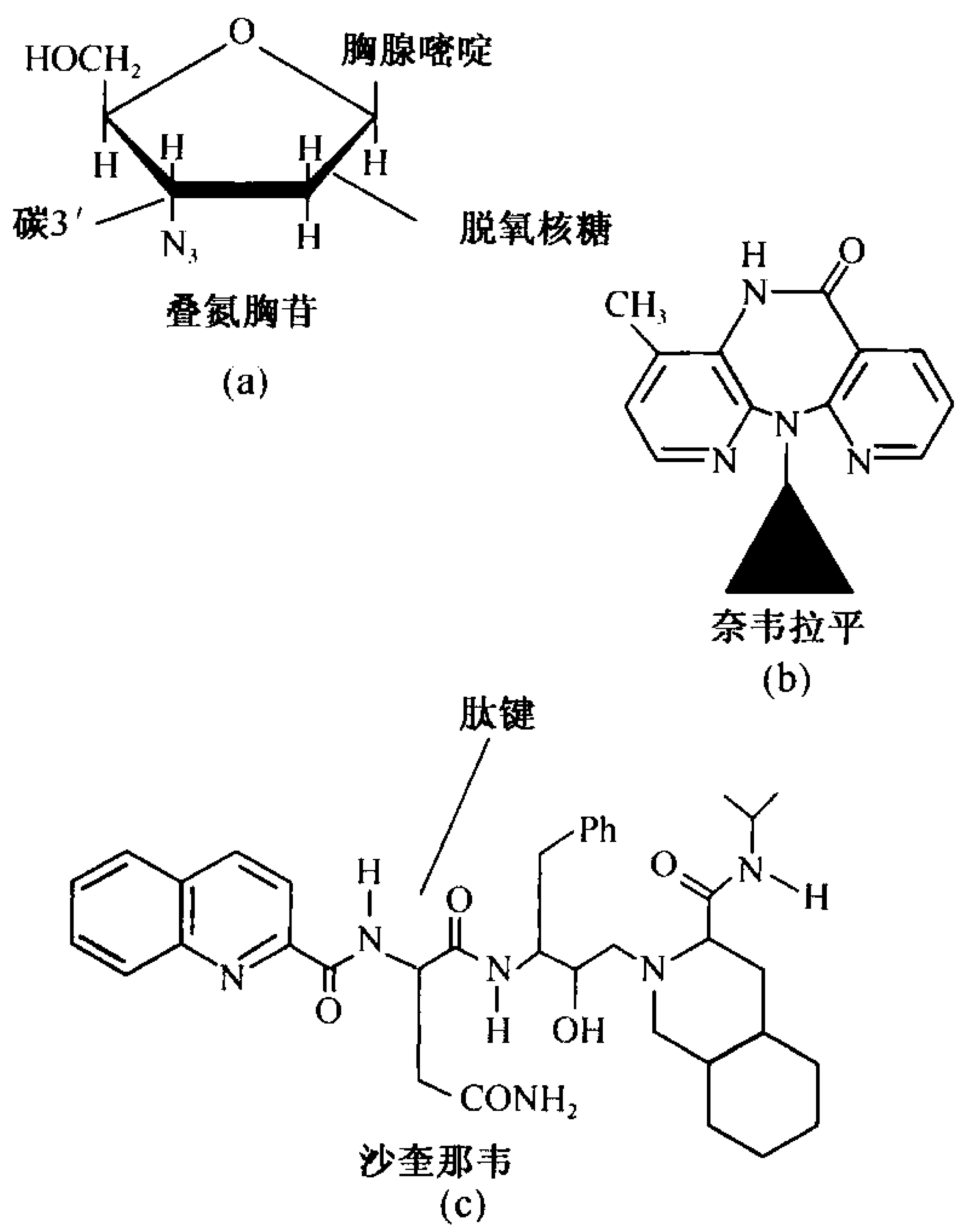


图 26.38　HIV/AIDS 化学治疗药物举例。 (a) 叠氮胸苷（AZT），一种核苷类似物。AZT 缺失 3′羟基导致核酸链延伸终止（当这种类似物掺入时），抑制病毒复制。(b) 奈韦拉平，一种非核苷反转录酶抑制剂，与催化位点直接结合，也是抑制核酸链的延伸。(c) 沙奎那韦，一种计算机模拟设计的蛋白酶抑制剂，与 HIV 蛋白酶的活性位点相符合（见 20.13 节）。沙奎那韦是肽类似物，茶色高亮区显示的是与肽键相似的区域。阻断 HIV 蛋白酶的活性可以阻止 HIV 蛋白质的加工和病毒的成熟（图 20.28）。

表 26.4　用于治疗 HIV/AIDS 的已批准的化学治疗剂

药物	作用机制
叠氮胸苷（azidothymidine、AZT、ZDV 或 zidovudine）（图 26.38a）	核苷类似物；反转录酶抑制剂；核酸链合成终止子；增加了 AIDS 患者的存活时间，降低了机会感染的发病率；对骨髓细胞有毒性；在多药物治疗策略中可以和其他药物合用
双脱氧胞苷（ddC 或 zalcitabine） 双脱氧肌苷（ddI 或 didanosine） 司他夫定（stavudine，d4T） 拉米夫定（lamivudine，3TC）	核苷类似物；反转录酶抑制剂；作用机制和效果同 AZT；可能在某些患者中毒性小于 AZT；在多药物治疗策略中可以和其他药物合用
依非韦伦（efavirenz） 奈韦拉平（nevirapine，图 26.38b） 地拉韦定（delavirdine）	非核苷反转录酶抑制剂（NNRTI）；直接与反转录酶结合并破坏其催化位点；不与核苷竞争；在多药物治疗策略中可以和其他药物合用

续表

药物	作用机制
茚地那韦（indinavir） 奈非那韦（nelfinavir） 沙奎那韦（saquinavir，图 26.38c）	蛋白酶抑制剂；计算机设计的肽类似物，设计与 HIV 蛋白酶活性位点结合，抑制病毒多肽加工和病毒成熟；在多药物治疗策略中可以和其他药物合用
恩夫韦地（enfuvirtide）	融合抑制剂；人工合成的多肽，与 gp41 蛋白结合并抑制 HIV 膜与宿主细胞膜的融合

第二类抗 HIV 药物是非核苷反转录酶抑制剂（non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor，NNRTI）（图 26.38c 和表 26.4）。这些化合物通过与反转录酶蛋白的相互作用及改变其催化位点的构象直接抑制反转录酶的功能。不幸的是，反转录酶基因的单突变经常足以降低这些药物的有效性。

另一类抗 HIV 药物是蛋白酶抑制剂（protease inhibitor）（图 26.38c 和表 26.4）。蛋白酶抑制剂是计算机设计的肽类似物，通过与加工酶——HIV 蛋白酶（见 20.13 节）活性位点的结合抑制病毒多肽的加工，此作用会抑制病毒成熟。然而，与其他以酶为靶点的化学治疗（反转录酶，见前）相同，HIV 蛋白酶基因的单突变就能够使这些药物无效。

最后一类抗 HIV 药物只有一种代表——恩夫韦地（enfuvirtide），它是一种由 36 个氨基酸人工合成肽组成的融合抑制剂，通过与 HIV 病毒的 gp41 膜蛋白结合而起作用（表 26.4）。蛋白质结合阻止了病毒与 CD4 细胞膜融合所需的构象变化。恩夫韦地用于在常规的 HAART 治疗后产生了抗药性或病毒量升高的 HIV 阳性个体。

由于药物抗性问题，对 HIV 感染者推荐的典型治疗策略是至少用一种蛋白酶抑制剂加两种核苷类似物（表 26.4）。多药物治疗可降低出现药物抗性毒株的可能，因为病毒需要同时产生三种药物的抗性。然后，用 RT-PCR 跟踪病毒量的变化从而监测复合治疗的效果。有效的方案在几天内就会将病毒量降低到不可检测的水平（每毫升血少于 500 拷贝 HIV）（图 26.37），随后是无限期的继续治疗和监测病毒量。如果病毒量重新回复到可检测水平，表明出现了药物抗性 HIV 毒株，需要更换药物鸡尾酒（即之前所使用的混合药物）。

除了药物抗性，一些抗病毒药物还对宿主具有毒性。许多病例中，患者不能很好地耐受核苷类似物，可能的原因是它们干扰了宿主的某些功能，如细胞分裂（表 26.4）。一般来讲，患者对 NNRTI 和蛋白酶抑制剂具有较好的耐受性，主要是它们只干扰病毒特定的功能。但是，药物抗性联同对宿主的毒性还是 HIV 治疗中的主要问题，新的化学治疗药物和药物使用方案正在不断地开发，以适应患者的需要。

AIDS 免疫

HIV 的遗传变异性极大地阻碍了 AIDS 疫苗的开发。一种制作疫苗的策略就是制备包膜蛋白 gp120 的抗体，用这种抗体阻断 CD4-gp120 的相互作用（图 26.35），从而阻止感染。gp120 亚基的疫苗现处于人的三期临床阶段（普通公众使用前的最后一步）。疫苗由两种变体 gp120 蛋白组成，已知这些变体 gp120 在泰国的地区性人群中普遍存在，疫苗的测试也在泰国。不幸的是，通用疫苗的开发可能不会成功，因为编码 gp120

的基因常发生突变，造成蛋白质抗原性的变异，而不能为不同形式的抗体识别。

临床免疫继续向亚单位疫苗（subunit vaccine）发展（见 31.8 节）。这些疫苗中，用基因工程手段将编码几种 HIV 包膜蛋白的基因导入疫苗病毒或腺病毒颗粒。用这些无害的病毒作为表达载体和运送 HIV 抗原的工具。几种亚单位疫苗能够引起接种者对 HIV 有效的体液和细胞免疫反应。

其他潜在的候选免疫方案包括用灭活的完整 HIV（killed intact HIV）作疫苗，这些灭活的疫苗只限于已感染 HIV 的患者使用。因为灭活的过程不可能 100%杀死 HIV；如果用这种疫苗给未感染者哪怕只带来很小的风险感染 HIV，也是缺乏职业道德的。接下来，一些实验室正在研究开发用于免疫制剂的减毒活病毒（live attenuated virus），这一策略是基于 HIV-2 感染的发现。HIV-2 是 HIV-1 的同种病毒，潜伏期长，只引起温和的 AIDS，HIV-2 感染的个体可以不被 HIV-1（引起严重 AIDS）感染。尽管这样，仍有巨大的潜在风险，如整合的病毒可能会引起癌症，突变会重新激活毒性等。

总之，现有大约 20 种不同的 AIDS 免疫方法正在开发中，但是还没有哪种方法被发现有保护作用并且安全。另外，AIDS 的免疫对于治疗多数的已感染患者可能不会有效果，因为他们缺乏足够的免疫能力，不能对疫苗产生应答。这样，尽管我们在 HIV 感染的结构和功能机制方面具备了可观的知识，对 AIDS 的发展进程也有了清晰的了解，但是仍然没有经过证实的能够预防或治愈 HIV/AIDS 的医学手段。公共宣传和避免高危行为还是预防 HIV/AIDS 的主要手段（见知识窗：性行为和 AIDS）。

概念检查

AIDS 是现今人群中最流行的传染性疾病之一。HIV 破坏免疫系统，机会病原体就会杀死宿主。现在仍没有 HIV 的有效疫苗。然而，有几种抗病毒药物可以减缓 AIDS 的发展。唯一的预防 HIV 感染传播的手段就是避免某些行为，诸如静脉药物注射（共用针头）和不安全的性行为。

◆ 回顾 AIDS 的定义。所有 AIDS 患者的共同诊断特征是什么？

◆ 治疗 HIV 感染最常用的方法是什么？是否有效？副作用如何？

知识窗：性行为和 AIDS

性滥交通常和性病有联系，但是书中本章和其他章介绍 AIDS 流行病，主要关注多性伴侣的危险和某类性行为的高危险性。HIV/AIDS 仅仅是一种类型的性传播疾病，其他还包括淋病、梅毒、单纯疱疹、非特异性尿道炎（由衣原体引起）、原生动物性阴道炎（由阴道毛滴虫引起）、真菌性阴道炎（由白假丝酵母引起）和性病疣（由人类乳头状病毒引起）。一些性病贯穿着人类有记录以来的历史。然而，AIDS 是独一无二的。没有任何药物或免疫方法能够治愈或预防 AIDS。治疗 AIDS 的药物昂贵且只有发达国家可以使用，所以 5000 万或更多的 HIV 感染者中的 90%没有治疗的途径。AIDS 每年杀死超过 200 万人，并且这个数字还会上升，因为感染并传播 HIV 达 10 年的个体才会发展为晚期 AIDS。

由于AIDS与某种性行为有关，所以避免这种性行为就可以预防AIDS。美国公共卫生署发布了一个报告，建议希望降低AIDS感染风险的人按照如下条款执行：

1. 避免用嘴接触阴茎、阴道和直肠。

2. 避免所有可能造成直肠、阴道或阴茎割伤或内部撕裂的性行为。

3. 避免和高危人群成员的性行为，这包括卖淫者（男性和女性），滥交的男同性恋，双性恋和静脉药物使用者。

4. 如果与高危人群成员发生了性行为，需要进行血检以确认是否感染了HIV。要记住，因为免疫反应时间滞后，在一年或更久以后要重复血检。如果检测结果阳性，HIV阳性个体的性伴侣在性交时必须用保险套进行保护。

AIDS不仅是男同性恋者的疾病，某些文化背景下，AIDS在女性中和男性中一样常见。在美国，AIDS传播增长最快的是通过异性性伴侣传播。疾病与滥交和其他交换体液的行为有关，不仅包括男性同性恋，而且也包括女性卖淫和静脉药物注射。

有没有不会带来AIDS感染风险的性行为呢？有些性行为比其他的安全。安全的性行为包括干吻（闭嘴）、相互手淫（皮肤无破口）和有保险套保护的性交。危险的性行为包括湿吻（张嘴）、在皮肤破口处手淫、口交（男性或女性）和未保护的性交（阴道或肛门）。美国公共卫生署建议如果性伴侣的健康状况不明的话，在所有交换体液的性行为中都要使用保险套。



AIDS的流行使人们重新关注保险套（见照片）。在性行为中保险套起到两个作用：疾病保护和预防怀孕。虽然最好的预防AIDS的办法是避免危险的性行为，但当和任何感染状态未知的个体性交时应该带上乳胶保险套。美国公共卫生署强烈建议任何婚姻以外的性行为都带上保险套。某些国家通过大范围的广告宣传直率地提倡使用保险套。

提倡一夫一妻制、节欲、避免婚外性行为甚至警告HIV感染的潜在致死后果并不能控制AIDS的流行。研究其他性传播疾病的结果表明，对疾病的恐惧并不足以阻止危险的性行为。某些个体的性欲很强以至于会抑制对疾病（甚至像AIDS）的恐惧。每个人都应该负责任地保护自己不受感染。

若想了解关于AIDS的更多信息，公共健康服务中心提供免费咨询电话，the CDC National STD and AIDS Hotline 800-342-2437。网址：http://www.ashastd.org/nah/。

复习题

1. 为什么革兰氏阳性菌比阴性细菌造成更多的呼吸道感染？（见26.1节）

2. 链球菌呼吸道感染的典型症状是什么？为什么链球菌感染需要及时的治疗？（见 26.2 节）
3. 描述白喉的致病原因和症状。疾病的症状是由感染造成的还是毒性造成的？请解释。怎样预防白喉？（见 26.3 节）
4. 描述百日咳的致病原因和症状。描述疫苗技术的改善——得到更安全的百日咳疫苗。（见 26.4 节）
5. 描述结核分枝杆菌感染的发展进程。感染是否一定造成有活性的结核病？原因是什么？为什么在美国不使用 BCG 疫苗？（见 26.5 节）
6. 描述脑膜炎球菌血症和脑膜炎的症状。如何治疗这类疾病？各自的预后如何？（见 26.6 节）
7. 比较和对比麻疹、流行性腮腺炎和风疹。在讨论中应包括对这些疾病的病原体、主要症状和感染潜在后果的描述。为什么妇女在青春期前接种预防风疹的疫苗很重要？（见 26.7 节）
8. 为什么感冒和流感是如此常见的呼吸道疾病？针对每个疾病至少给出两个造成高发病率的原因。（见 26.8 节）
9. 区分致病性葡萄球菌和正常菌群中的葡萄球菌。（见 26.9 节）
10. 指出证明幽门螺杆菌和胃溃疡关系的证据。怎样治疗溃疡患者？（见 26.10 节）
11. 描述主要的致病性肝炎病毒。它们相互间的关系怎样？如何传播？（见 26.11 节）
12. 在 20 世纪 60 年代中期，为什么淋病的发病率大幅上升？同时梅毒的发病率实际上下降了？（见 26.12 节）
13. 对性传播的疾病衣原体感染、疱疹和滴虫病，描述治疗的方法。对每种病来说，是否都能够有效治愈？原因是什么？（见 26.13 节）
14. 描述 HIV 病毒如何有效地破坏体液免疫和细胞免疫。为什么 HIV 疫苗很难研发？（见 26.14 节）

应用题

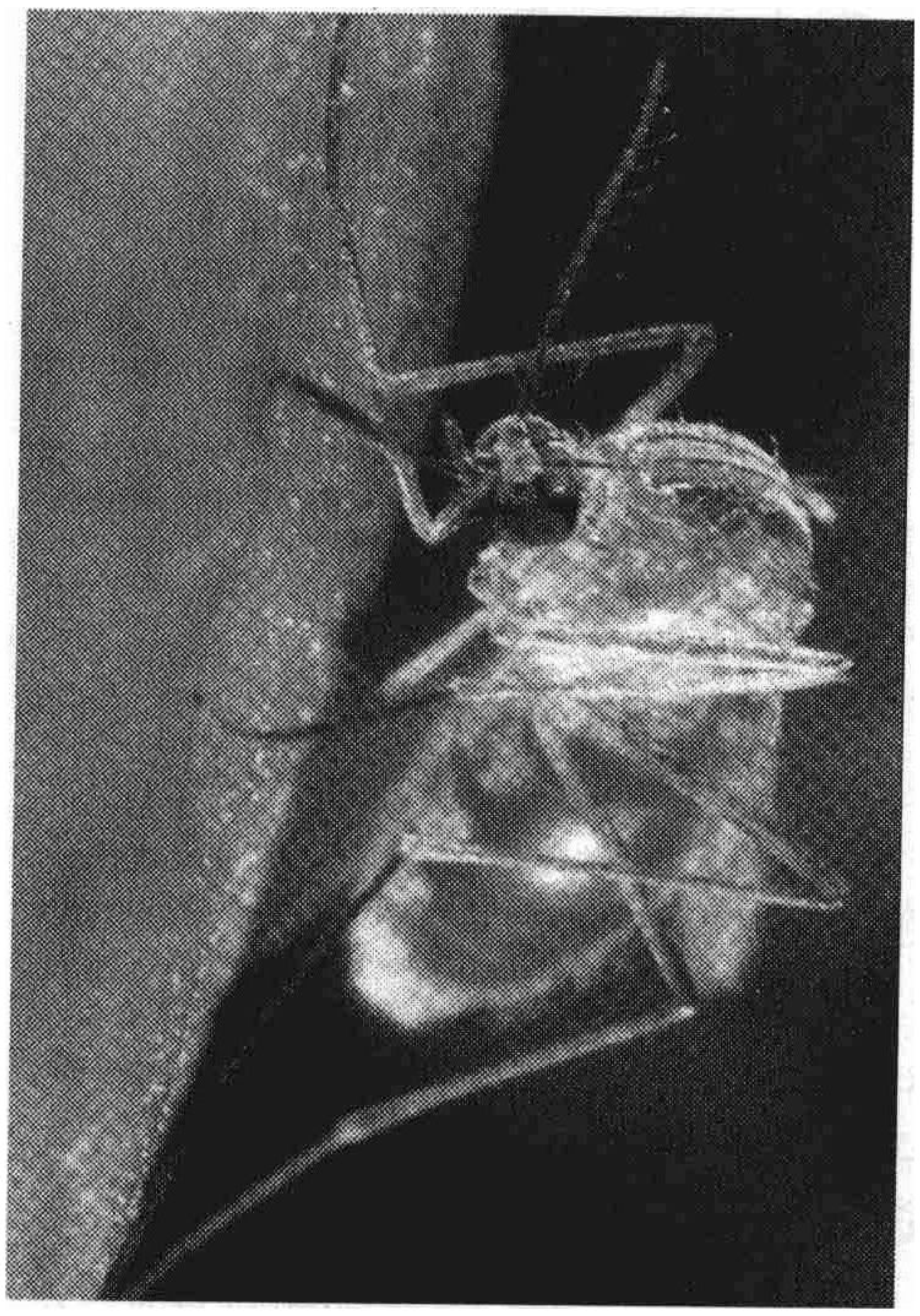
1. 怎样控制百日咳的流行？如何预防它？既然该病的发病率不再下降，采用你的预防措施来对付目前的小型流行（见 26.4 节）。你的措施是否昂贵？
2. 为何结核病通常造成肺功能永久性下降，反之其他呼吸疾病往往只引起暂时性的问题？
3. 你的大学同室周末回家，得了严重的疾病，在地区医院诊断为细菌性脑膜炎。由于他的离开，学校对他的病并不知情。你要怎样做来保护自己？应该通知学校健康部门吗？
4. 麻疹、流行性腮腺炎和风疹曾经是非常常见的儿童疾病。但是，现在如果这些疾病暴发的话就会被视为严重事件，要求立即得到公共健康部门的关注。请从每种疾病的流行性、疫苗的有效性和潜在的后果等方面解释这种态度上的转变。
5. 讨论流感病毒抗原性转变的分子生物学原理和对宿主产生的免疫学后果。为什么抗原性转变使得有效的单一通用型流感疫苗无法获得？接下来，比较抗原性转变和抗原性漂变。哪种机制对于流感病毒的进化更为重要？哪个引起最大的抗原性变化？哪个给疫苗开发者造成最大的麻烦？原因是什么？

6. 按疾病的严重程度（包括短期和长期影响）给肝炎病毒排序。
7. 作为宿舍公共健康顾问组的组长，你有责任提供衣原体病、疱疹和滴虫病等所有性传播感染的有关信息。除了本书，你还可以从哪里得到有关 STI 的可靠信息？介绍每种 STI 的有关预防、症状和治疗的信息。你的计划是否涵盖了每种疾病？对于每种疾病，讨论其社会的、法律的和公共健康的问题，对于鉴别感染患者的性伴侣这些都是必须考虑的。

（徐海津　译，宋存江　校）

27

动物、节肢动物以及土壤传播的微生物疾病



蚊子传播以来死亡最多的传染病——疟疾和新出现的病原体——西尼罗病毒。

词汇表

埃里希氏体病（ehrlichiosis）：一类新出现的扁虱传播的疾病，由立克次氏体中埃里希种（*Ehrlichia*）引发

汉坦病毒肺综合征（hantavirus pulmonary syndrome，HPS）：一种新型的急性病毒性疾病，以呼吸道肺炎为特征，由啮齿动物传播的汉坦病毒引发

莱姆病（lyme disease）：是一种新型的偏虱传播的疾病，其主要病原体是布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）

疟疾（malaria）：一种昆虫传播的疾病，特征是周期性的高烧和贫血，其病原体为原生动物疟原虫（*Plasmodium* spp.），通常通过疟蚊（*Anopheles mosquito*）叮咬在哺乳动物中传播

真菌病（mycosis）：由真菌引起的感染性疾病

鼠疫（plague）：一种啮齿类动物中的流行性疾病。由鼠疫杆菌（*Yersinia pestis*）引起，能够偶尔通过跳蚤叮咬传播给人

狂犬病（rabies）：一种通常致命的、由狂犬病毒引起的神经系统疾病，通过已感染该病毒的动物咬伤或其唾液传播

立克次氏体（rickettsia）：专性细胞内寄生属，可引起斑疹伤寒症、洛基山斑疹热和埃里希氏体病等

落基山斑疹热（Rocky Mountain spotted fever）：一种偏虱传播的疾病，由立氏立克次氏体（*Rickettsia rickettsi*）引起，能引起高烧、头疼、皮疹和胃肠道综合征

镰形细胞贫血（sickle cell anemia）：一种遗传性血液病，其遗传特性使其获得对疟疾的抗性，但其血红蛋白对氧的亲和力下降，从而造成红细胞的功能低下

地中海贫血（thalassemia）：一种遗传上的特性，使其获得对疟疾的抗性，但改变了红细胞中的酶使其功能下降

破伤风（tetanus）：一种随意肌僵直性瘫痪的疾病，由破伤风梭菌的外毒素引起

斑疹伤寒（typhus）：一种由寄生虫传播的疾病，其病原体为普氏立克次氏体（*Rickettsia prowazekii*），能引发高烧、头疼、虚弱、皮疹、导致中枢神经系统和内部器官的损伤

西尼罗（脑炎）热（West Nile fever）：一种由西尼罗病毒引起的神经系统疾病，通过蚊子由鸟类传染人类

人兽共患病（zoonosis）：一种能传播给人类的动物疾病

近年来，数以百万计人死于昆虫传播的疾病，这使得人类的历史和进化过程为之改变。这些疾病包括瘟疫、疟疾等。今天，像莱姆疏螺旋体病、汉坦病毒肺部综合征、西尼罗热这些昆虫和动物传播的疾病已经成为重要的疾病，甚至于世界上许多高度发达的国家也难以免受这些疾病的侵袭。除此之外，依靠土壤传播的疾病也成为一个重要的难题，因为土壤中的有机体不能被有效控制。例如，破伤风即便可以完全预防，仍然是一种严重的、致死率很高的疾病。

所有的这些疾病的病原体都是寄生在人体以外的。在这章中，我们来看看由动物媒

介、昆虫媒介以及土壤传播的病原体和它们所引发的疾病。由动物传播的病原体的天然宿主是非人类脊椎动物，当被感染的动物群体与人体接触时，便会传染给人体。虫媒传播疾病的病原体可通过节肢动物载体的咬伤扩散到新的宿主，病原体依靠被感染的宿主生存。正像疟疾这种疾病所表现出来的，人类常常成为这些病原体生命过程中的一个偶然宿主。土壤传播疾病的病原包括各种真菌以及梭菌家族中的某些成员。

Ⅰ 动物传播的疾病

人畜共患病（zoonosis）是一种可以通过直接接触、空气中悬浮物质或咬伤等途径传播给人类的动物疾病，通过对家畜施行免疫措施以及良好的兽医护理，可以减少家畜患病，从而防止其传染给人类。野生动物（feral animal）不会被按时接种疫苗，也不接受兽医护理。那么在野生动物中每隔一定时期就会发生一次人畜共患病。在下一部分中，我们将看到动物传播疾病的两个重要实例：狂犬病和汉坦病毒肺综合征。

27.1 狂犬病

狂犬病（rabies）是那些主要发生在动物身上，但在某种情况下会传给人的典型例子。美国狂犬病的主要来源是野生动物，主要是浣熊、臭鼬、山狗、狐狸和蝙蝠。然而，在家畜中也有为数不多，但影响较大的病例发生（图 27.1）。

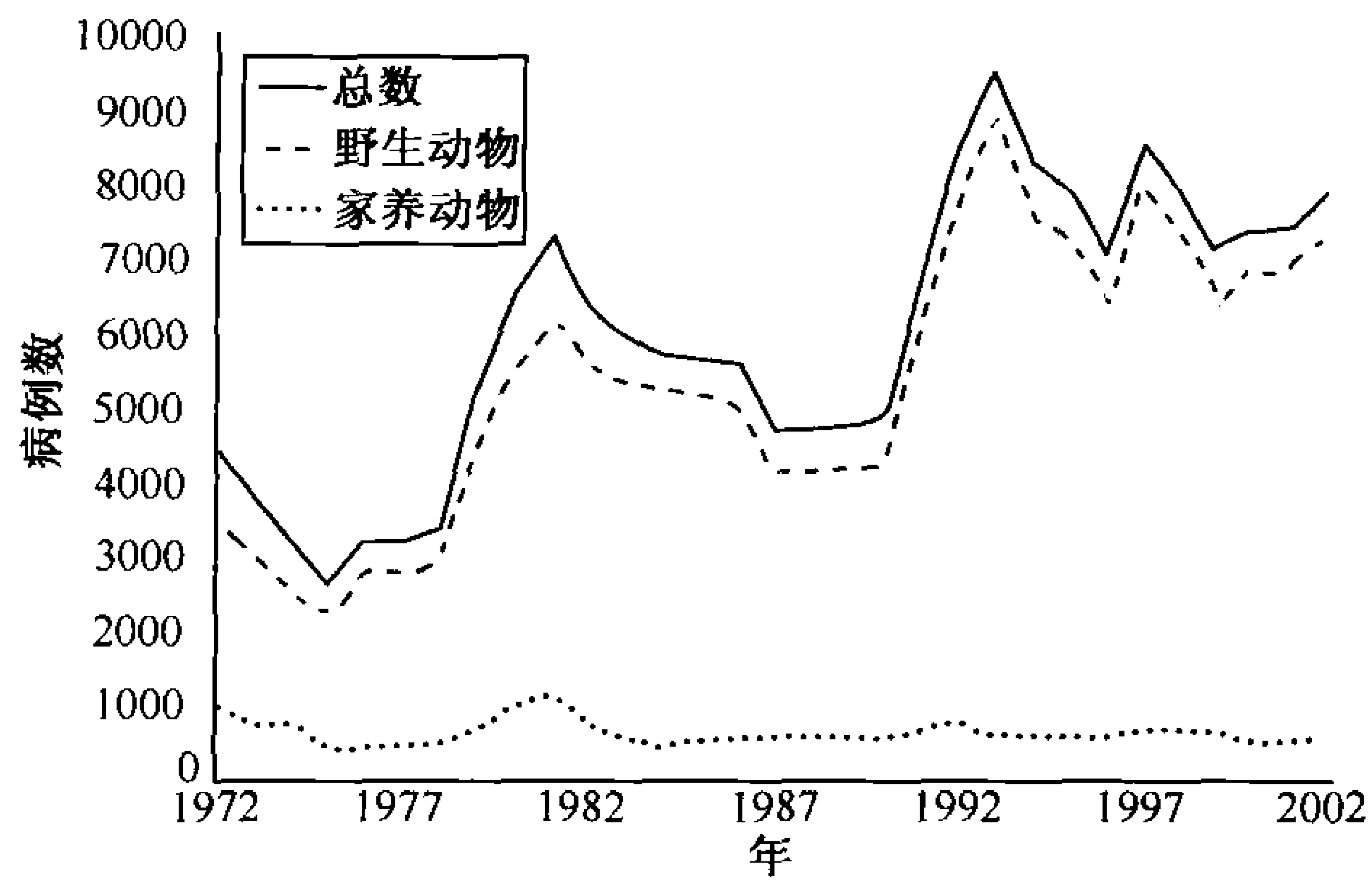


图 27.1　美国野生和家养动物中狂犬病例的报道。自 1990 年以来，人类患狂犬病的案例有 30 起，其中死亡 8 起。狂犬病在野生动物种群中发生的很普遍，特别是在美国东部的浣熊中。据报道，患病案例数目在降低几年后会有新的周期性上升，这是由于因狂犬病死亡，宿主种群发生了变化所致。高案例数目表示被感染个体数目众多。高感染率种群个体大批死亡，在几年内，低感染率的种群阻止了狂犬病的蔓延，因此案例数目得以降低。当高感染率种群数目恢复后，狂犬病再度发生，案例数目增加，宿主数量再次减少，这个循环得以持续。在家畜中每年发生的 500 多起狂犬病几乎都是因为接触了野生动物。数据来自位于美国亚特兰大的疾病控制和预防中心。

流行病学

狂犬病也是人类的主要疾病。全世界大约（每年）有 52 000 人死于这种疾病，多数是在饲养狗等家畜相对普及的发展中国家。全世界每年大约有一百万被动物咬伤而接受狂犬病治疗的人。

狂犬病是由弹状病毒家族中的单链 RNA 病毒（负链 RNA 病毒，见 16.9 节）引起的，它主要攻击大多数恒温动物的中枢神经系统，如果不加以治疗最终必然导致死亡。这种病毒通过感染狂犬病毒的动物咬伤或通过感染者的唾液污染黏膜进入机体。它在感染部位增殖后传播到中枢神经系统。症状发生的潜伏期差异较大，取决于伤口的大小、位置和深浅，以及咬伤时实际传播的病毒数量。狗的平均潜伏期为 10～14 天。人类可以在长至 9 个月或更长时间后才会表现出狂犬病症状。

这种病毒在脑内增殖（特别是丘脑和下丘脑）导致高烧、亢奋、瞳孔放大、唾液分泌增加和焦虑。由于喉部肌肉不可控制的痉挛而发展为狂犬病，最终由于呼吸系统麻痹而死亡。对于人类来说，如果不对狂犬病感染进行处理而使得病症发展到综合征阶段，其结果将是致命的。

诊断、治疗和预防

狂犬病在实验室中可通过检查组织样品来诊断。荧光抗体检测或免疫过氧化物酶检测可以进一步验证狂犬病的临床检测结果。免疫过氧化物酶检测是用单克隆抗体来识别狂犬病病毒感染的脑组织或角膜组织，这种方法既可以用于潜在发病动物体也可以用于已死亡的机体。除此之外，通过活体组织切片检查或从尸体样本神经细胞质中检到特征性病毒包含体内基氏小体（图 27.2）也被用来确证狂犬病。反转录 PCR 检测和测序也被用来证实临床样本中的特定狂犬病毒株的存在。

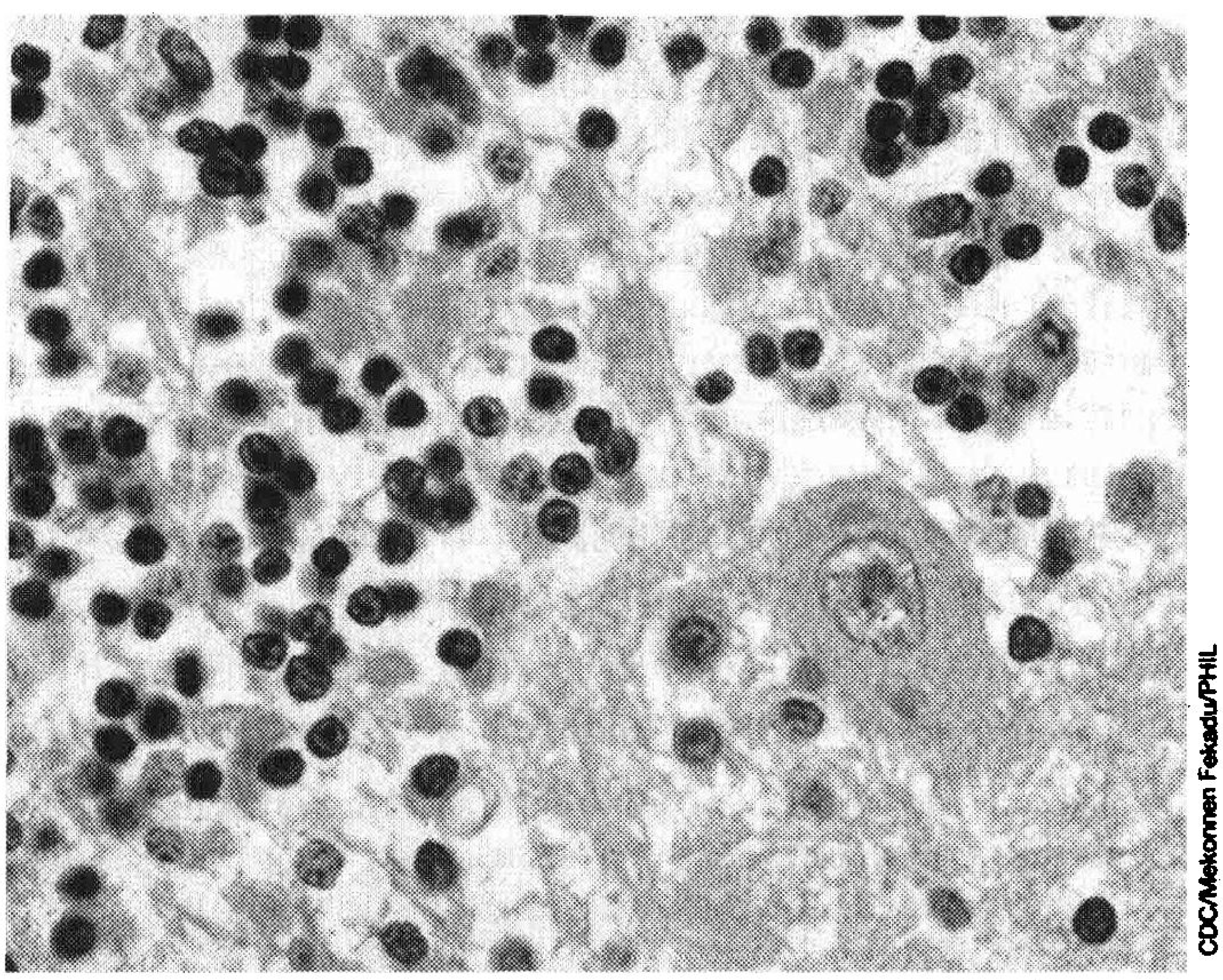


图 27.2 经苏木精和曙红染色的狂犬病患者脑组织部分。狂犬病病毒引起的特征性病毒包含体即内基氏小体。在这里可以看见它们为染成黑色的，完全可以区分的，直径 2～10μm 的球体，分布于整个细胞质中。内基氏小体包含狂犬病病毒抗原。

由于狂犬病的致死特征，任何与可能患有狂犬病动物的接触都要小心。对疑有狂犬病的野生动物应该捕获，杀死并立刻检查是否患有狂犬病。如果是狗、猫或雪貂等一般的家畜咬了人，在伤口没有感染的情况下，一般都是把家畜保留 10 天观察是否有狂犬病的临床症状。如果咬人的动物是野生的，或家畜表现出狂犬病的症状，或者 10 天后仍不能作出决定，被咬伤的人就必须注射免疫球蛋白（从超免疫个体中得到的纯化后的抗狂犬病毒抗体）（见 22.13 节），肌肉和伤口处都要注射。患者还应该免疫灭活狂犬病病毒。表 27.1 列出了一系列对可能患狂犬病的人的治疗方法。因为狂犬病在人类中发展缓慢，这些组合后的免疫治疗方法几乎 100%有效，可以阻止这种活跃疾病的发生。

表 27.1　对可能接触狂犬病病毒的人的处理指导

被未激怒的家养动物咬伤
怀疑动物有狂犬病
1. 杀死动物，检测狂犬病病毒
2. 立刻开始对伤者进行治疗
动物不被怀疑有狂犬病
1. 观察 10 天，如果没有症状，就不需要治疗伤者
2. 如果症状有所发展，应立即进行治疗
被野生食肉动物（如臭鼬、蝙蝠、狐狸、浣熊和小狼）咬伤
应认为有狂犬病
1. 杀死动物、检测狂犬病
2. 立刻开始对伤者实行治疗
被野性啮齿类动物、松鼠、牲畜和兔子咬伤
要与当地或州的公共卫生官员们商量这些动物（这些动物几乎不传播狂犬病）近期是否有传播狂犬病的事例
如没有报道，伤者就不需治疗
所有的咬伤伤口都需用肥皂和水清洗。治疗方法一般为同时注射狂犬病免疫球蛋白和人二倍体细胞狂犬病疫苗（5 次肌内注射）

狂犬病大多是通过免疫来预防。目前美国已经对人和家畜进行了灭活狂犬病疫苗的免疫，而整个世界范围内也应用了各种灭活及减毒制剂。因为需要较长的接种时间，并且目前对于潜在感染的个体的被动和主动免疫已经足够用来预防这种疾病。因此，除一些担负高风险的人群，如兽医和动物园管理人员以外，对于人体进行狂犬病的预防免疫不是必要的。

这种狂犬病预防措施已经被证实极为成功，应用了这种措施之后，美国每年报道的人患狂犬病的病例还不足三起，且几乎都是被野生动物咬伤所引起的。由于家畜经常会接触到野生动物，因此所有猫狗必须在 3 个月大时接种疫苗，且每年或每三年必须接种加强疫苗。其他家畜，包括大型农场动物，也应该接种狂犬病疫苗。然而，最有效的狂犬病预防以及彻底根除的措施在于控制发生在野生动物中的大型病毒库中的疾病，这至少在美国是正确的。如果所有或者大多数病毒库成员被免疫，这种疾病就能控制住，甚至可能绝迹。现在，已经生产出了含有编码狂犬病毒衣壳蛋白的狂犬病毒基因的亚单位疫苗（见 31.8 节）。因为口服制剂也有效，所以可以在食物中加入亚单位疫苗作为“诱饵”来免疫当地的野生动物种群，以减少狂犬病的发病几率和传播。这种疫苗成为一种完全安全的有效控制野生动物狂犬病毒库的方法，也可能最终根除这种疾病。

概念检查

狂犬病主要发生在野生动物中，但是也可以传播到家畜中然后传播到人。对猫狗的免疫对于控制狂犬病很重要。在发展中国家，狂犬病仍然是一种重要的人类疾病。

◆ 为什么在美国没有对人们进行例行狂犬病免疫？

◆ 怎样对待人患狂犬病？

27.2 汉坦病毒肺综合征

汉坦病毒（Hantavirus）是导致汉坦病毒肺综合征（hantavirus pulmonary syndrome，HPS）的病原体，汉坦病毒肺综合征是一种严重呼吸道综合征。汉坦病毒因韩国汉坦市得名，汉坦市是出血热暴发，以及这种病毒首次被确认为人类病原体的地方。1993 年，汉坦病毒感染在美国四个边缘地区（亚利桑那州、科罗拉多州、新墨西哥州和犹他州）暴发，其病原体载体最终可追溯到这些地区中的鹿鼠（*Peromyscus maniculaus*）种群。这次暴发使得 53 人被感染，其中 32 人死亡，这使得人们开始重视从各种病毒库中直接传播引起疾病发生的潜在危险。

汉坦病毒与出血热病毒（如拉沙热病毒、埃博拉病毒）（见 25.11 节）有关，这些病毒都是偶尔可以从动物病毒库传播到人类中。汉坦病毒属（*Hantavirus*）是布尼亚病毒家族的成员之一，是一种有囊膜单链 RNA 病毒（见 16.8 节）（图 27.3）。这个病毒家族包含一系列可引起汉坦病毒肺综合征和出血热肾病综合征（hemorrhagic fever，HFRS）的病毒。

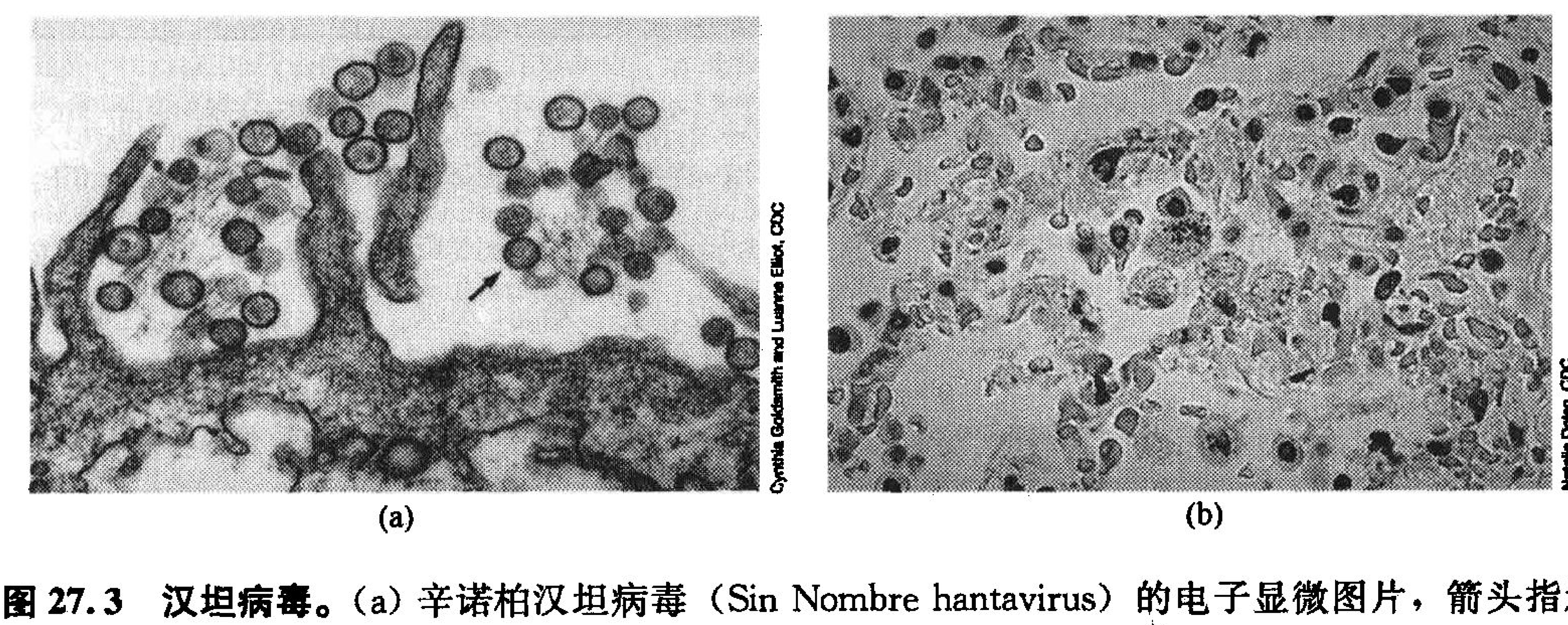


图 27.3 汉坦病毒。(a) 辛诺柏汉坦病毒（Sin Nombre hantavirus）的电子显微图片，箭头指示为毒粒之一。该病毒直径大约 0.1μm。(b) 肺泡巨噬细胞种安第斯汉坦病毒（Andes hantavirus）抗原的免疫染色。每一深蓝色颗粒着色区域指示单个巨噬细胞被感染（直径大约 15μm）。汉坦病毒属于布尼亚病毒科，与其他在系统发生上相似的病毒一样，如里夫特山谷热病毒（Rift Valley virus）、埃博拉病毒（Ebola virus），能够导致高死亡率的出血热。

流行病学

汉坦病毒多发生于啮齿动物中，包括一些种类的老鼠、旅鼠、野鼠等，在其他动物中也时有发生。HFRS 病毒株在东半球更为常见，而且近年已经导致很多起 HFRS 疾病的暴发。目前每年平均发现 200 000 起病例，多发生于中国、韩国和俄罗斯。HFRS 毒株在西半球更受研究人员的重视，对于这些病毒的生态学的持续研究将有可能导致另外一些病原性毒株的发现。

汉坦病毒最普遍的传播途径是通过吸入被病毒感染的啮齿动物的排泄物而感染疾病。人类可能是一种偶然性宿主，因为只有当人们接触到啮齿动物和它们的粪便时才会被感染。例如，1993 年，美国四个发生 HPS 的区域的感染者们都接触过老鼠和它们的粪便，这是由于当年冬天气温较高而使得啮齿动物的数量异常增加。通过空气中悬浮物质途径感染是最常见的，多数悬浮物质来自于老鼠的粪便或干尿并以烟尘形式存在。极少有报道人传播给人的病例，有一些病例是通过啮齿动物咬伤来传播 HPS 或 HFRS 的。

病理学、诊断、治疗和预防

汉坦病毒肺部综合征的症状表现为突发高烧，肌肉疼痛，血小板减少，白细胞增多，以及肺部毛细血管渗漏。在 50%病例中，患者会因肺水肿（液体渗漏进肺部引起窒息）加速休克和心脏病并发症而在几天内死亡。这些病症对于辛诺柏汉坦病毒很典型，这种病毒正是引起美国四州发病的罪魁祸首。不同的病毒种也会引起其他的病症，例如，美国东南部啮齿动物中常见的小河湾病毒会引起肾功能衰竭。

如果从感染者体内得到的汉坦病毒可以在组织培养物中生长（见 9.3 节），这一毒株可以通过血清学技术来鉴定，包括病毒噬斑减少性中和试验。这个测试主要检测患者血清中是否存在抑制组织培养物中病毒噬斑形成的抗体（见 9.3 节）。ELISA（酶联免疫分析）是鉴定患者的血液中是否存在相关抗体（见 24.10 节），这种方法应用更广泛。还可以通过聚合酶链反应（PCR）来分析患者的组织或血液样本中是否存在病毒基因组，从而得出是否感染的结论（见 24.12 节）。

对于任何一种汉坦病毒都没有特定的治疗方法或特定的疫苗。然而，可以通过避免与啮齿动物和它们的聚居地的接触来预防这种疾病的发生，因为这种疾病是通过与啮齿动物分泌物的接触来传播的。人类可以采取一些措施来减少与啮齿动物的接触。例如，摧毁老鼠的巢穴，限制它们的食物来源（如将食物放在密封的容器中），以及围剿性地根除它们。要根除这种疾病很困难，因为在给定区域内的相当大数量的啮齿动物都已经被地方性的汉坦病毒毒株所感染。例如 1993 年美国四州暴发病情事件，对当时鹿鼠血清进行回顾性免疫检测，结果表明 30%的地方鼠群携带有辛诺柏汉坦病毒。

概念检查

汉坦病毒在全世界范围内的啮齿动物种群中发生，如果偶然传播到人类中，会引起严重的疾病，如汉坦病毒肺部综合征。美国直到 1993 年才开始意识到汉坦病毒的感染。

◆ 为什么汉坦病毒在美国直到1993年才被认作一种重要的公众健康难题?
◆ 描述汉坦病毒传播到人类的过程。举例说出一些预防汉坦病毒感传染的有效方法。

Ⅱ 节肢动物传播的疾病

感染了病原体的节肢动物携带者如果咬伤宿主，就可以将病原体传播到宿主体内，如立克次氏体病（rickettsial disease），人类成为了这种病原体的偶然宿主。然而，正如疟疾中表现出来的，感染的人也在病原体的生命过程中起到重要的作用。

27.3 立克次氏体病

立克次氏体（*rickettsias*）严格存在于脊椎动物通常是哺乳动物的细胞内，它是一种小细菌，并在一定程度上与跳蚤、虱或蜱等吸血的节肢动物的自然循环有关。我们在12.13节中讨论了立克次氏体的生物学。立克次氏体可以引起人和动物的多种疾病，最主要的是斑疹伤寒（typhus fever）、落基山斑疹热（Rocky Mountain spotted fever）和埃里希氏体病（ehrlichiosis）。立克次氏体名字源于美国芝加哥大学一位著名科学家Howard Ricketts，他首次提供了立克次氏体存在的证据，并死于普氏立克次氏体（*Rickettsia prowazekii*）感染造成的斑疹伤寒。立克次氏体不能在人工培养基上培养，但能在实验动物、虱、哺乳动物组织培养细胞和鸡胚的卵黄囊中培养。在动物体内，它们主要在吞噬细胞内生长（见22.1节）。

虽然立克次氏体还不能在纯天然培养基中生长，但是普氏立克次氏体的1.1Mb基因组已经测序成功（见15.5节）。与其他基因序列的同源性比较表明，这些胞内寄生物与人类线粒体有较高的同源性。像线粒体一样，立克次氏体基因组通过自我剪切以适应细胞内环境并依赖于胞内环境。立克次氏体不具有某些独立能量代谢和结构上生物合成所必需的基因。立克次氏体基因组还包含了与植物病原体根瘤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的*virB*操纵子具有极高同源性的毒力基因（见19.21节）。这个操纵子编码与DNA转移和蛋白质分泌系统相关的毒素因子成分。因此，普氏立克次氏体的基因组序列证实了立克次氏体具有胞内依赖性和这些病原体的毒性。

立克次氏体可根据其引发的临床疾病分为三类。它们是①斑疹类（typhus group），如普氏立克次氏体（*Rickettsia prowazekii*）；②斑疹热类（spotted fever group），如立氏立克次氏体（*Rickettsia rickettsi*）；③埃里希氏类（ehrlichiosis group），如恰菲埃里希氏体（*Ehrlichia chaffeensis*）。在这里，我们将举例对每类病原体进行分析。

斑疹伤寒类：普氏立克次氏体

斑疹伤寒是由普氏立克次氏体（*R. prowazekii*）引起的。流行性斑疹伤寒是通过身体或头虱在宿主间传播的。人类是迄今为止所知斑疹伤寒的唯一宿主。在第一次世界大战期间，斑疹伤寒传遍了整个东欧，大约300万人丧生。在战争期间斑疹伤寒是军队中的大问题。由于战争期间的手术医疗卫生条件恶劣，虱子在士兵中间传播很快，斑疹

伤寒因而得以大范围流行。到第二次世界大战时，因斑疹伤寒死亡的军人数量比战争死亡的还多。

当虱子咬过的裂口被虱子的排泄物——普氏立克次氏体的主要来源污染时，立克次氏体细胞则通过皮肤进入机体。在 1～3 周的潜伏期内，这种生物在小血管壁细胞内增殖，然后开始出现斑疹伤寒的症状（发烧、头痛、浑身乏力）。5～9 天以后会在腋窝出现典型的斑疹（rash），通常会遍布除脸、手掌和足底以外的全身。如果不加以治疗，则会出现并发症，如中枢神经系统、肺、肾和心脏的损害。流行性斑疹伤寒致死率达 6%～30%。

四环素和氯霉素在控制普氏立克次氏体（*R. prowazekii*）中十分有用。

斑疹伤寒立克次氏体（*Riskettisia thphi*）引起小鼠斑疹伤寒，是另外一种重要的斑疹类立克次氏体。

斑疹热类：立氏立克次氏体

落基山斑疹热最早于大约 1900 年在美国西部被确认，但目前在美国南部非常普遍。

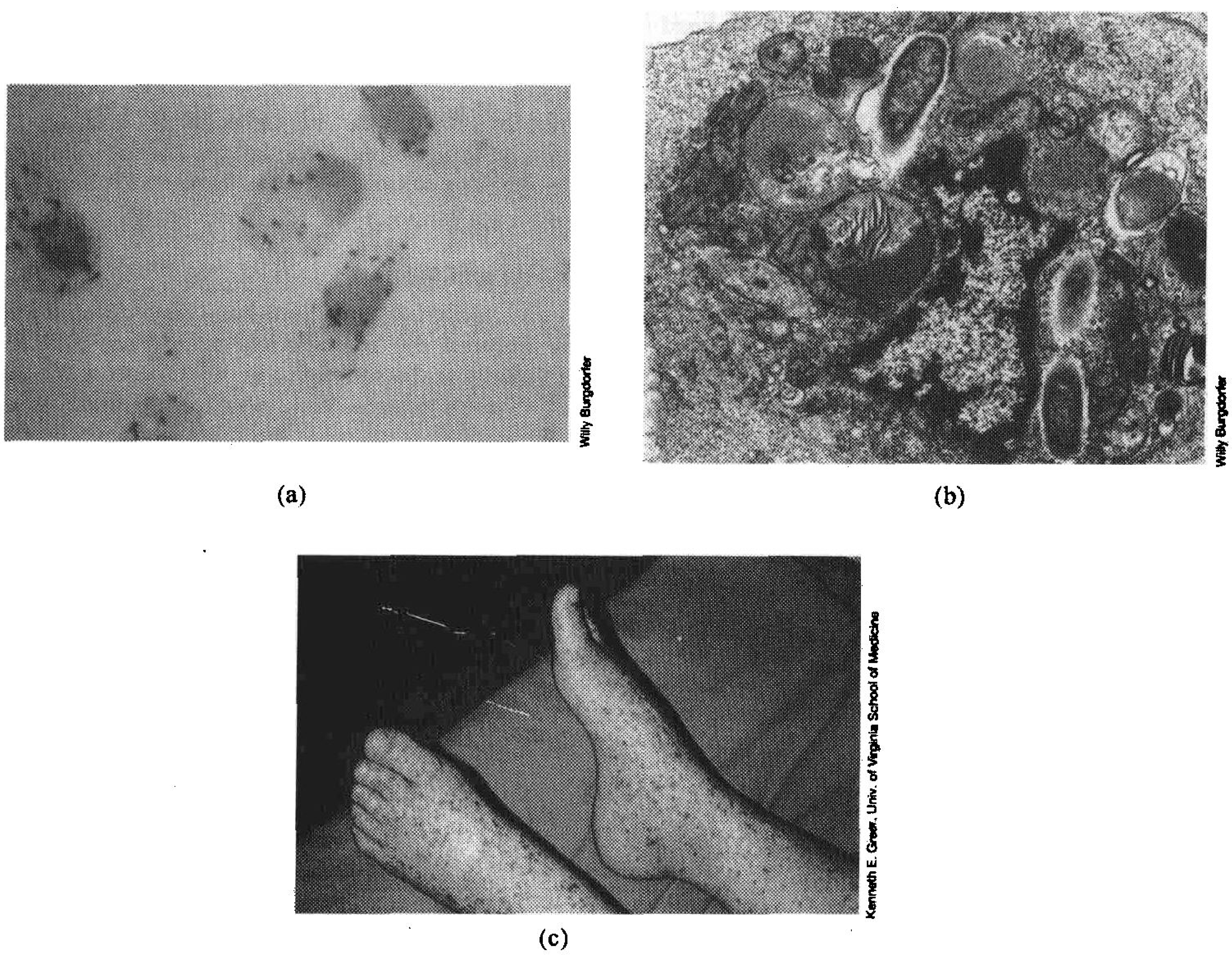


图 27.4　立氏立克次氏体——引发落基山斑疹热的原因。(a) 蜱血细胞质和细胞核内生长的立氏立克次氏体细胞。个体直径大约为 0.4μm。(b) 感染木蜱的粒状血细胞中的立克次氏体细胞。(c) 患者脚上的疹子。全身各部位出疹表明患者得了落基山斑疹热，而这正是区分落基山斑疹热与斑疹伤寒的临床特征，如果是斑疹伤寒，则不会有全身出疹。立克次氏体是依赖于宿主哺乳动物细胞内生存的一种小型细菌。它们的代谢过程依赖于宿主细胞的功能，这已经在第 12.13 节中讨论过。立氏立克次氏体的 1.1Mb 基因组序列已经测定（见 15.5 节）。

落基山斑疹热是由立氏立克次氏体（*Rickettsia rickettsii*）引起的，它通过各种蜱，常见的是狗蜱和木蜱传播给人类。落基山斑疹热的发病率相对较低，但是每年仍有500～1000人患病。人类从蜱的排泄物中获得病原体，这些排泄物主要通过咬伤注入机体或通过划伤使感染物质接触皮肤。立氏立克次氏体的细胞与其他立克次氏体不同，它可以生长在宿主细胞的细胞核和细胞质内（图27.4a和图27.4b），经过3～12天的潜伏期后，急性症状会突发，主要是发热和严重的头痛，3～5天以后，全身出现斑疹［这些立克次氏体斑疹的位置可以作为诊断的依据（图27.4c）］。通常也可以观察到腹泻和呕吐等胃肠反应，如果不加以治疗，那么落基山斑疹热的症状会持续2个星期以上。在感染的初期如使用四环素或氯霉素则可以很快痊愈。但是即使是已经接受过治疗的患者仍然面临5%致死率的危险。如果是没有接受过治疗的患者致死率会达30%。

埃里希氏体类：埃里希氏体

埃里希氏体属（*Ehrlichia*）（见12.13节）引发了两种美国正在流行的蜱传播疾病——人类单核细胞埃里希氏体病（human monocytic ehrlichiosis，HME）和人类粒细胞埃里希氏体病（human granulocytic ehrlichiosis，HGE）。引发这两种疾病的立克次氏体分别为恰菲埃里希氏体及一种和恰菲埃里希氏体类似或相同的生物。

这些埃里希氏体病（ehrlichiosis）的发病症状类似流感，使其临床上无法区分，其症状为发烧、头痛、乏力、白细胞减少或者血小板减少。实验研究发现其症状还包括肝功能的变化，即转氨酶升高。此外，在外周血白细胞中可见埃里希细胞包含体（图27.5）。除了包含体外的其他症状与其他立克次氏体病很相似，但是埃里希氏体属与其他重要的立克次氏体种属在抗原性上有很大差异。感染从无症状感染到致死都存在。始终不采取治疗措施容易引起长期的并发症，包括呼吸和肾功能障碍，以及严重的神经性疾病。

可以依靠对于患者血清的间接荧光抗体检测（见24.9节）以及对全血或血清的聚合酶链反应（PCR）来检测埃里希氏体DNA的存在（见24.12节）。

埃里希氏体病通过已感染蜱的咬伤传播。哺乳动物库除了人类外还包括鹿，也可能还有啮齿动物。以往对于蜱传播疾病高发区域的血清学分析表明HGE可能是一种比落基山斑疹热还流行的疾病。许多例感染都没有正确地鉴定是由于病症不固定。然而，从1998年以来，埃里希氏体病已经在美国广泛报道（见25.9节）。每年平均有500起病例报道，其中包含HGE 60%、HME 40%。医生们渐渐开始熟悉这种正在出现的疾病，埃里希氏体病将会被越来越频繁地报道。

正像其他蜱传播疾病一样，人们多是在蜱生活区域进行户外活动时接触到蜱而感染上埃里希氏体病的，尤其是打高尔夫和远行者更加容易被感染。对于埃里希氏体病的预防措施包括尽量减少与蜱生存环境的接触以避免被其咬伤，穿防蜱咬的衣物，用一些适当的驱虫剂（如DEET）。在群体水平上，通过广泛区域内喷洒杀螨剂（对蜱和相关节肢动物具有特异毒性的化学物质）以及移除蜱的生活环境如树叶和灌木丛可以有效降低蜱的密度。由半合成四环素得到的强力霉素对于治疗埃里希氏体病来说是一种很好的抗生素选择。

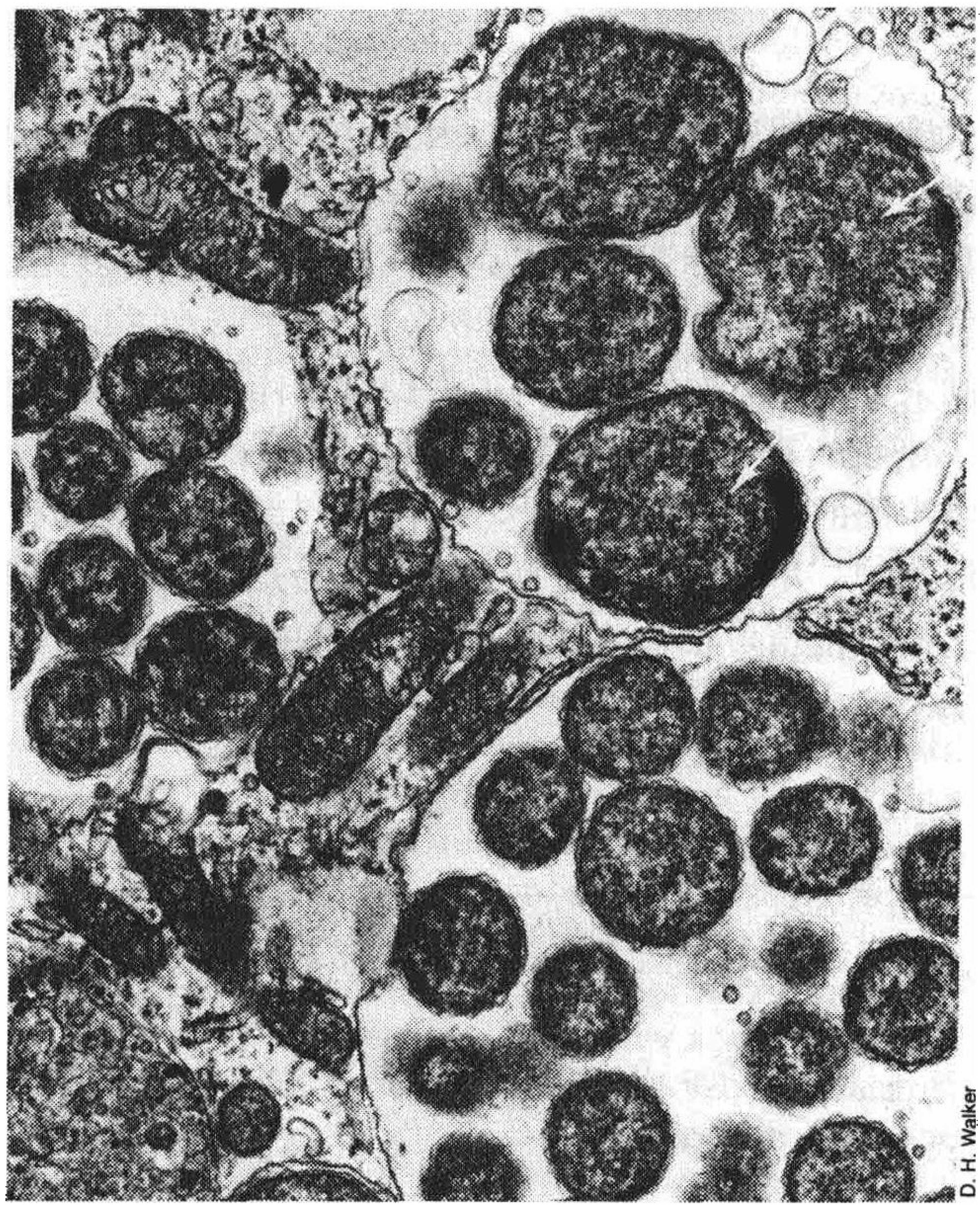


图 27.5　人类单核细胞埃里希氏体病的病原因子恰菲埃里希氏体（*Ehrlichia chaffeensis*）。电镜显示一个人类单核细胞中含有大量恰菲埃里希氏体的包含体。箭头指示出某个包含体中的两个细菌。恰菲埃里希氏体直径 300～900nm。

其他立克次氏体病

Q 热（Q fever）是由一种与立克次氏体（见 12.13 节）有关的专性细胞内生长的寄生虫——伯氏考克斯氏体（*Coxiella burnetii*）引起的类似肺炎的疾病。虽然它不通过咬伤直接传播给人类，但却可以通过昆虫的咬伤把致病物传给动物，而且各种节肢动物能作为感染库。家畜通常没有明显的感染，但在它们的尿、粪便、乳汁及其体液中却隐藏了大量的伯氏考克斯氏体。人类通过与这些动物或动物产品的接触而感染，症状由开始类似流感发展到后来持续发烧、头痛、打颤、胸痛、肺炎和心内膜炎。

实验室对伯氏考克斯氏体感染的分析包括各种免疫学测试，检测宿主体内是否产生病原体的抗体。血清学检测包括免疫荧光抗体检测（IFA）（见 24.9 节）。伯氏考克斯氏体感染对于抗生素四环素的反应十分强烈，通常一旦怀疑患有 Q 热应立即加以治疗以防心脏损伤。另外，Q 热是作为生物武器而被研究的传染病之一（见 25.12 节）。

灌木丛斑疹伤寒（*tsutsugamushi disease*）即恙虫病，存在于亚洲、印度大陆及大洋洲，是由东方恙虫（*Qrientia tsutsugamushi*）引起的。虽然这种疾病和斑疹伤寒很相似，但是它是由螨虫（mites）传播到啮齿动物宿主的。

诊断和控制

过去，对立克次氏体病的诊断十分困难，因为许多与立克次氏体病有关的特征性斑疹常与麻疹、猩红热和药物的副作用相混淆。特异性的免疫试剂有助于临床上对于立克次氏体病的确诊。它们包括荧光标记识别立克次氏体表面抗原的多克隆抗体或单克隆抗体，乳胶凝集试验和 ELISA 分析法（见 24.8 节，24.9 节和 24.10 节）及 PCR 分析（见 24.12 节）。控制大多数立克次氏体疾病需要控制载体虱、跳蚤和蜱。对于那些在树木和草丛中行走的人来说，在暴露的四肢上涂含 DEET 的驱虫药可以防止蜱的接触。对于那些吸附得非常牢固的蜱应使用钳子小心去除其口部。用汽油或乙醇等有机溶剂饱和棉拭子可以加速清除蜱。尽管疫苗对斑疹伤寒的防治是可行的，但仍有少量无效的报道。目前还没有行之有效疫苗可预防落基山斑疹或埃里希氏体病。

概念检查

立克次氏体是一种专性细胞内生长的寄生性细菌，它通过节肢动物的咬伤来传播。大多数立克次氏体传染病已能用抗生素治疗并加以控制，但是对这些疾病进行及时识别和诊断仍然很困难。

◆ 斑疹伤寒、落基山斑疹热和埃里希氏体病的节肢动物载体是什么?

◆ 预防立克次氏体感染可采取什么措施?

27.4 莱姆病

莱姆病（Lyme disease）是一种正在出现的影响人和动物的、蜱作载体的传染病。莱姆病是由康涅狄格州莱姆市而得名，在那里首先发现了这种病并很快成为美国流行的蜱传播的疾病。莱姆病是由螺旋体——布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）（图 27.6，见 12.33 节）引起的，它主要通过黑脚硬蜱（*Ixodes scapularis*）传播。这种带有布氏疏螺旋体细胞的蜱依靠鸟、家畜及各种野生动物的血液生活，有时是人的血液。

流行病学

在美国的东北部地区鹿和白蹄田鼠是其主要宿主。但在其他地区，不同种的啮齿类动物或蜱也可传播这种疾病。在美国西部，丹明尼硬蜱（*Ixodes dammini*）和木鼠是常见的载体和宿主。

目前，在欧洲和亚洲也发现莱姆病。在欧洲，蜱载体是蓖子硬蜱（*Ixodes ricinus*），可能也包含有嘎氏疏螺旋体（*Borrelia garinii*），这是另一种能引发类似莱姆病症的生物。在亚洲国家，另一种疏螺旋体 *Borrelia afzelii* 通过全沟硬蜱（*Ixodes persulcatus*）传播，能够引起莱姆病。所有不同地区的啮齿动物宿主都已经被确定。莱姆病体现了广阔的地域性分布，通过布氏疏螺旋体细胞传播。布氏疏螺旋体细胞具有广泛的宿主，包括啮齿动物和其他哺乳动物及与其亲缘关系十分接近的蜱种群。

黑脚硬蜱及该属的其他成员比许多其他类的蜱要小，所以容易被忽略（图 27.7）。

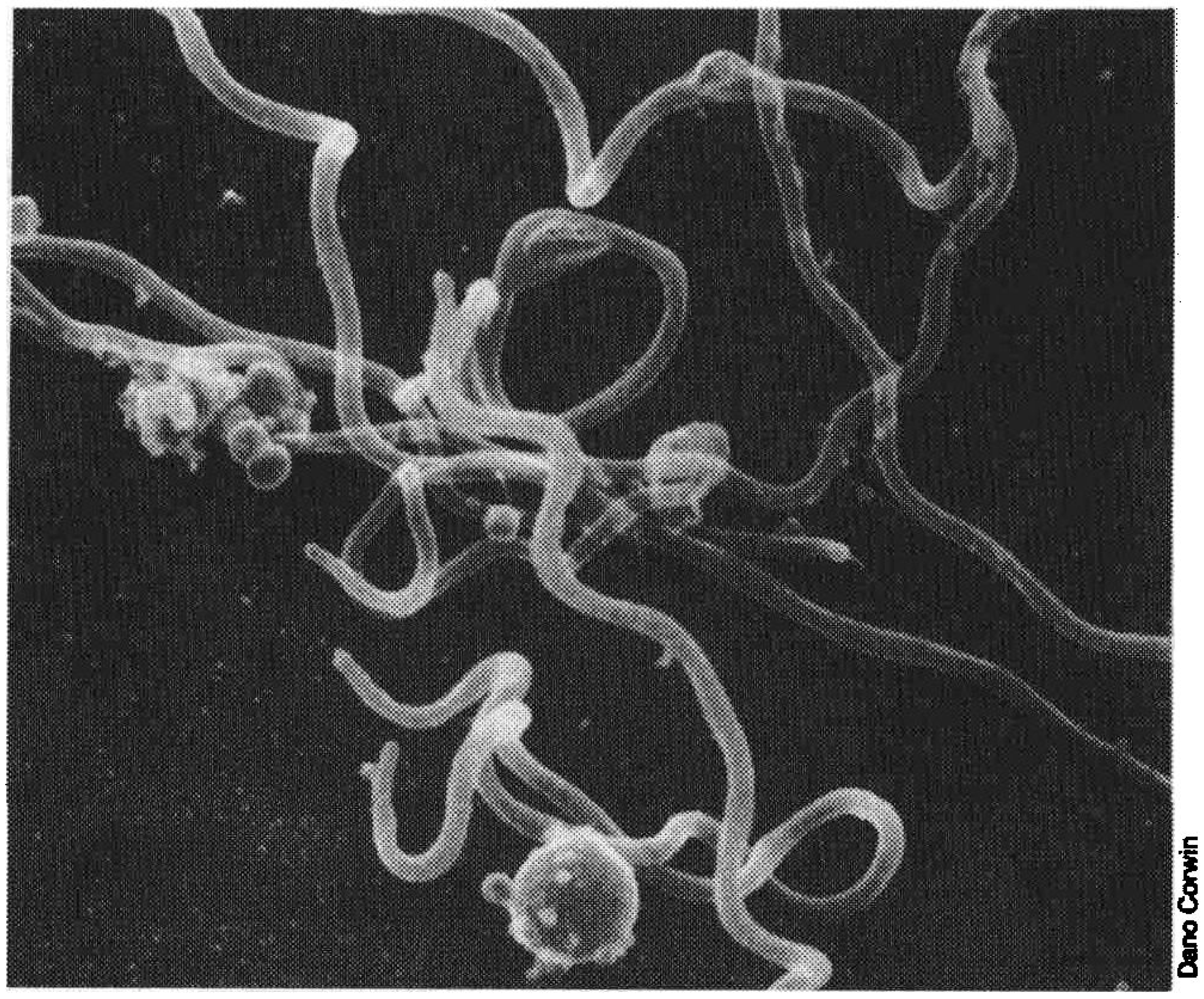


图 27.6　布氏疏螺旋体电镜照片。单个细胞的直径约为 0.4μm。

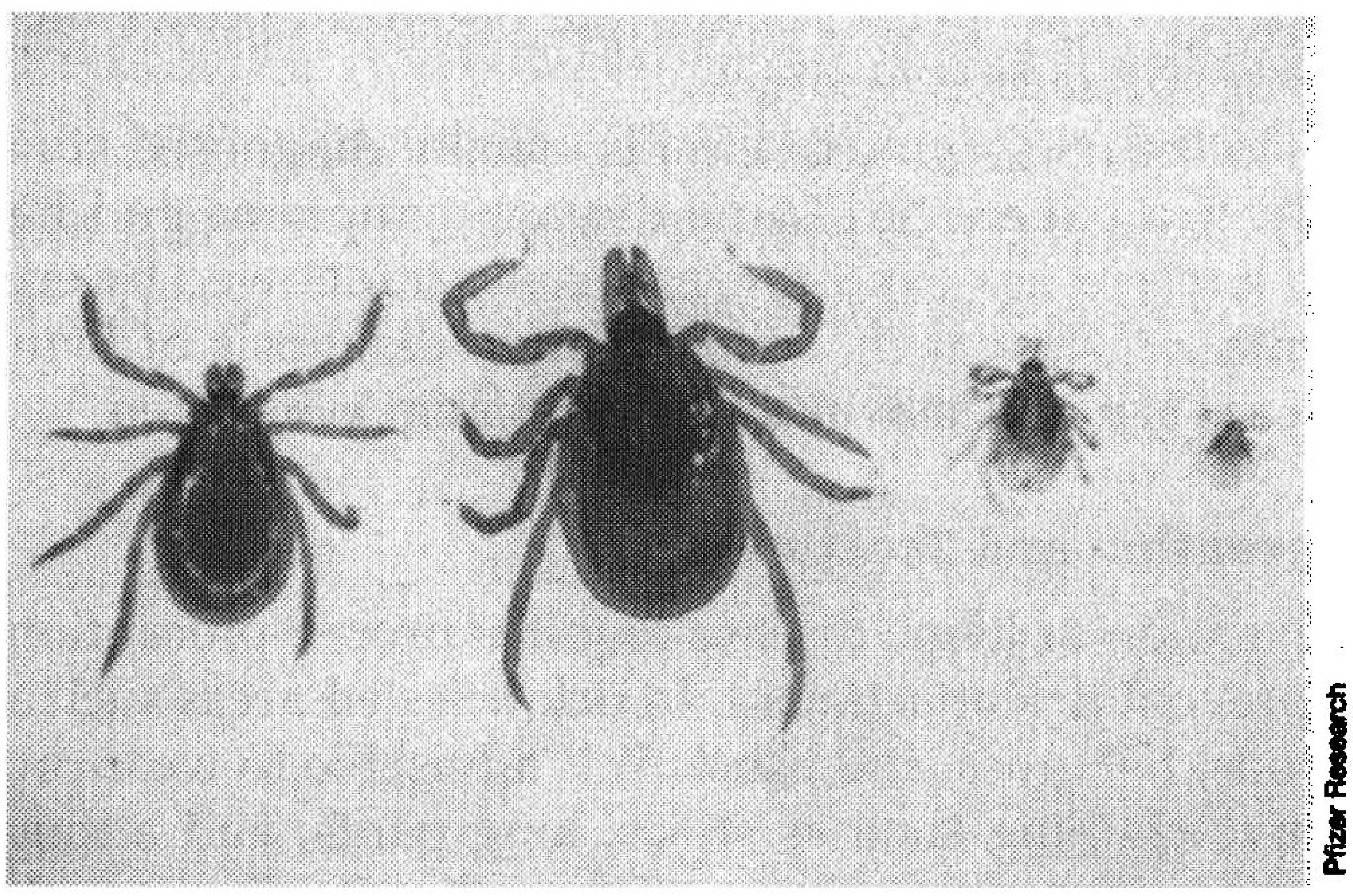


图 27.7　黑脚硬蜱，莱姆病的主要载体。从左到右依次为：雄性成蜱、雌性成蜱、蛹和幼虫。雌性成蜱长约为 3mm，都以吸人血为食，并能够传播疏螺旋体。

与其他蜱传播病不同，大多数（在东北某地区多达 50%）的黑脚硬蜱携带有布氏疏螺旋体细胞，所以频繁接触这种载体很容易感染这种疾病。

尽管大多数疾病都发生在美国东北部和中西部的上半部分，但目前在各个洲都有发生，而且莱姆病正以极快的速度向西和向南传播。图 27.8 表明了莱姆病在全美国的流行情况和总的发病数快速惊人的增长。

病理学

当蜱吸血时，布氏疏螺旋体细胞就会传播给人类（见图 27.9a）。全身性感染将导

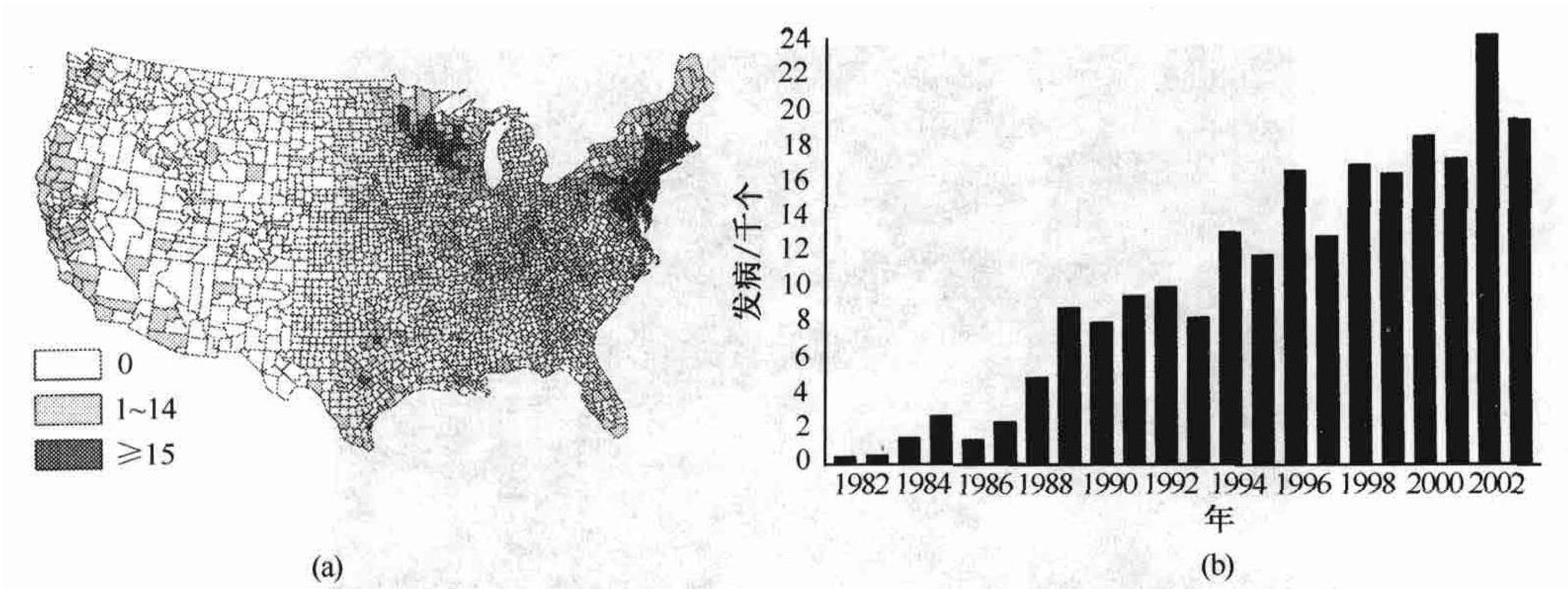


图 27.8 在美国莱姆病的发病率。(a) 2002 年美国莱姆病的发病率。每一个报道有莱姆病发生的州都用阴影显示，报道有 15 例以上的州用红色阴影显示。整个美国都发生了这种疾病，而在东北部与中西部更是广为流行。(b) 美国每年报道的莱姆病例总数。2002 年有 23 763 例，比以往任何一年都多。病情由国家疾病预防和控制中心报道。

致莱姆病的主要症状，包括急性头痛、背痛、冷颤和乏力。大约 75%的病例中都可在蜱咬伤处观察到大的红斑（erythema migrans，EM）(图 27.9b)。如果这时能正确地诊断，那么用四环素或青霉素是很容易治疗的。但如果没有很好地治疗，可能在咬伤之后持续几星期或几个月，莱姆病会进入慢性阶段。慢性莱姆病会使 40%～60%的患者患上关节炎。15%～20%的患者会出现麻痹、四肢无力，以及面部麻痹之类的神经性疾病症状。如果没有获得治疗，那么感染中枢神经系统的布氏疏螺旋体细胞就会潜伏很长一段时间。然后引起视觉障碍、面部麻痹和抽搐等其他慢性症状。

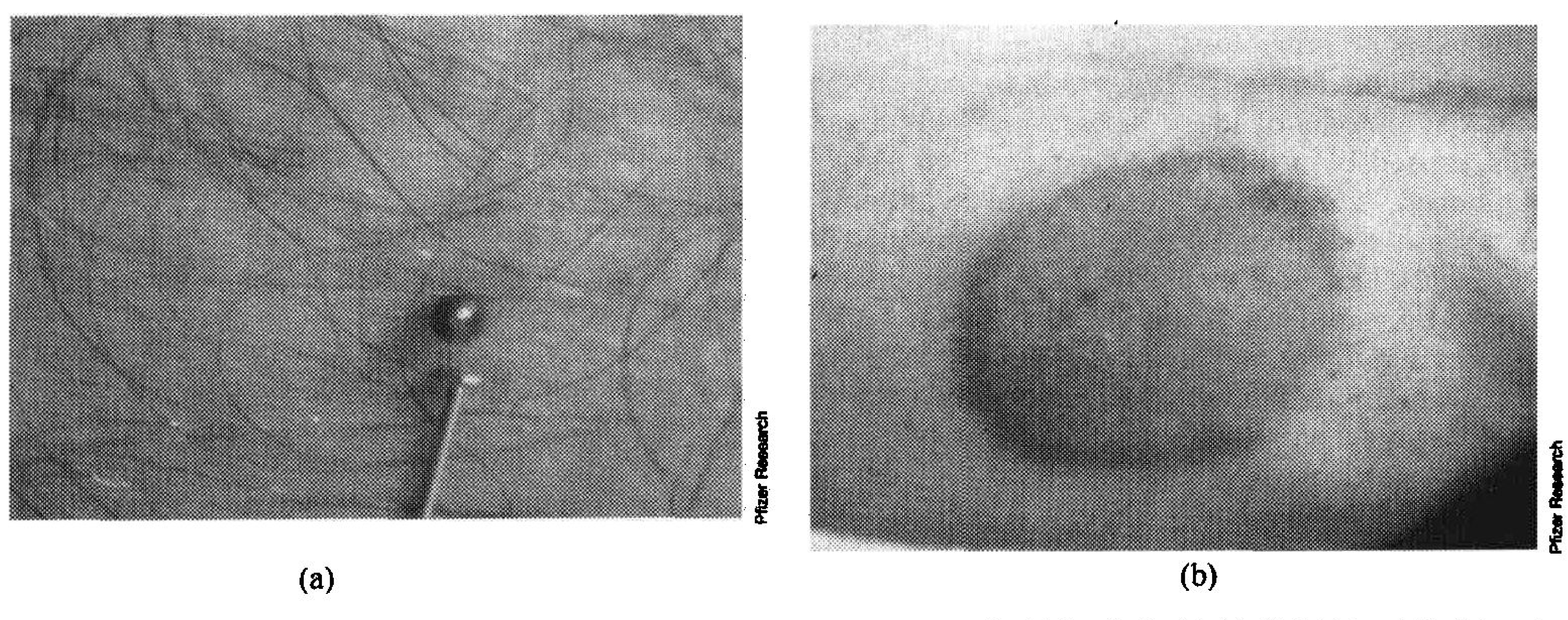


图 27.9 莱姆病感染。(a) 黑脚硬蜱从人身上吸血。(b) 与莱姆病相关的特征性环状斑。它是游走性红斑（EM），它一般开始出现于咬伤的伤口处，几天后变成环状。直径大约 5cm。

引发莱姆病的毒素或其他的致病因子还未鉴定出。莱姆病的潜在的症状在许多方面与梅毒十分相似，后者是由另外一种螺旋体——苍白密螺旋体（*Treponema pallidum*）引起的。实际上，莱姆病的一些神经系统的症状很像慢性梅毒。但与梅毒不同之处，尚未见莱姆病通过性接触或其他人类接触传播的报道。有一少部分布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferii*）细胞隐藏在人的尿中，这表明莱姆病可通过家畜特别是牛的

尿传播。

诊断

血清学检验已经发展成为检测布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）抗体的方法。抗体出现在感染后的 4～6 周，能用 ELISA 法或荧光标记的抗体方法检测（见 24.10 节和 24.9 节）。但由于这种血清学检测方法可以识别各种疏螺旋体表面的抗原，所以检测莱姆病的特异方法是蛋白质印迹法（见 24.11 节）。因为抗体对莱姆疏螺旋体抗原的反应可以在感染后持续多年，所以抗体的存在不一定就能表明已对此疾病产生免疫或是疾病是新近感染。

聚合酶链反应（PCR）也开始用于从多种体液和组织中检测布氏疏螺旋体。虽然此反应迅速且灵敏性高，但是它不能够区分处于正在发病中的活布氏疏螺旋体和已处理过或非活跃疾病中的无活性螺旋体。在接近 80％的最初游走性红斑病变组织中可以培养出布氏疏螺旋体（图 27.9b），但是培养物通常无法达到良好的效果，因为这种生物在一种高度特异的培养基中生长需要经历很长的潜伏期。

最后是临床上的诊断。如果一位患者具有莱姆病的症状，且最近接触过蜱，尤其是如果出现了红斑病变，那么就应该优先当作莱姆病来诊断，并使其接受抗生素治疗。

预防和治疗

预防莱姆病需要避免与蜱接触。在蜱侵染的地区如树林、草丛和灌木，需要穿上保护性的衣服如鞋子、长裤、具紧贴身领口和袖口的长袖衬衫，把长裤塞进袜子中并穿上长筒靴可以有效地防止与蜱的接触。在充满蜱的环境中呆上一段时间的人，应当仔细检查自己，并小心除去那些附着的蜱（包括头部）。在皮肤和衣服上使用含有 DEET 的杀虫剂十分有效。2001 年，市场上已经出现一种有效的人类莱姆病疫苗，但是却因较差的销售业绩和可能产生副作用而退出市场。应用于兽医护理方面的莱姆病疫苗随处可见。

对严重莱姆病可采用强力霉素（四环素产生，见 20.9 节）或阿莫西林（β-酰胺抗生素，见 20.8 节）治疗 20～30 天。确定的莱姆关节炎或其他症状表明了慢性布氏螺旋体感染，可采用大剂量青霉素或头孢霉素治疗，头孢霉素是一种 β-酰胺抗生素，它能穿越血-脑屏障，攻击中枢神经系统中驻留的疏螺旋体。长期的莱姆关节炎可用强力霉素或阿莫西林辅以羧苯磺胺来治疗。羧苯磺胺可使血清保持 30 天或以上高水平的抗生素。

概念检查

莱姆病是目前在美国最流行的节肢动物传播的疾病。它通过蜱从许多哺乳动物宿主传播给人类。莱姆病的预防和治疗非常简单，但问题是能否及时诊断。

- 莱姆病的最初症状是什么？
- 哪些抗生素可以用于治疗莱姆病？

27.5 疟疾

疟疾（malaria）是由一种原生动物——孢子虫纲中的一个成员引起的疾病（见14.10节）。疟原虫是一种最主要的人类病原体，它在人类的发展与进化中起着十分重要的作用。虽然已经出现了很多种治疗方案，但是疟疾仍然是一种重要的人类疾病。全世界有1亿多人患有疟疾，每年有100万人死于这种疾病（见25.1节）。人类是疟原虫的哺乳动物宿主。有四种孢子虫可以感染人类，最常见的是间日疟原虫（*Plasmodium viva*），最严重的是恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）。这种寄生虫在人体中完成部分生活周期，在蚊子中完成另一部分，蚊子导致其在人类中传播。只有按蚊属（*Anopheles*）的雌蚊才可以传播疟疾（图27.12a）。

流行病学

雌按蚊存在于世界较暖和的地区，因而疟疾主要发生在热带和亚热带。欧洲人在北美的北部定居以前那里没有疟疾，疟疾主要发生在南部地区，因为那里适合蚊子的生存和繁殖。这种疾病与沼泽地势低洼有关，*malaria* 名字正来自意大利语“坏空气”。

疟原虫的生活周期十分复杂（图27.10）。首先，人类宿主被蚊子内细长的疟原虫子孢子（sporozoites）感染，这种孢子一般存在于昆虫的唾液腺。蚊子将唾液（含有一种抗凝剂）和孢子注射到人体内，孢子顺着血流进入肝脏，在那里它们可能不引起反应，也可能导致发病。在人的肝脏中复制，孢子进入裂殖体期，这时细胞增大并裂解成

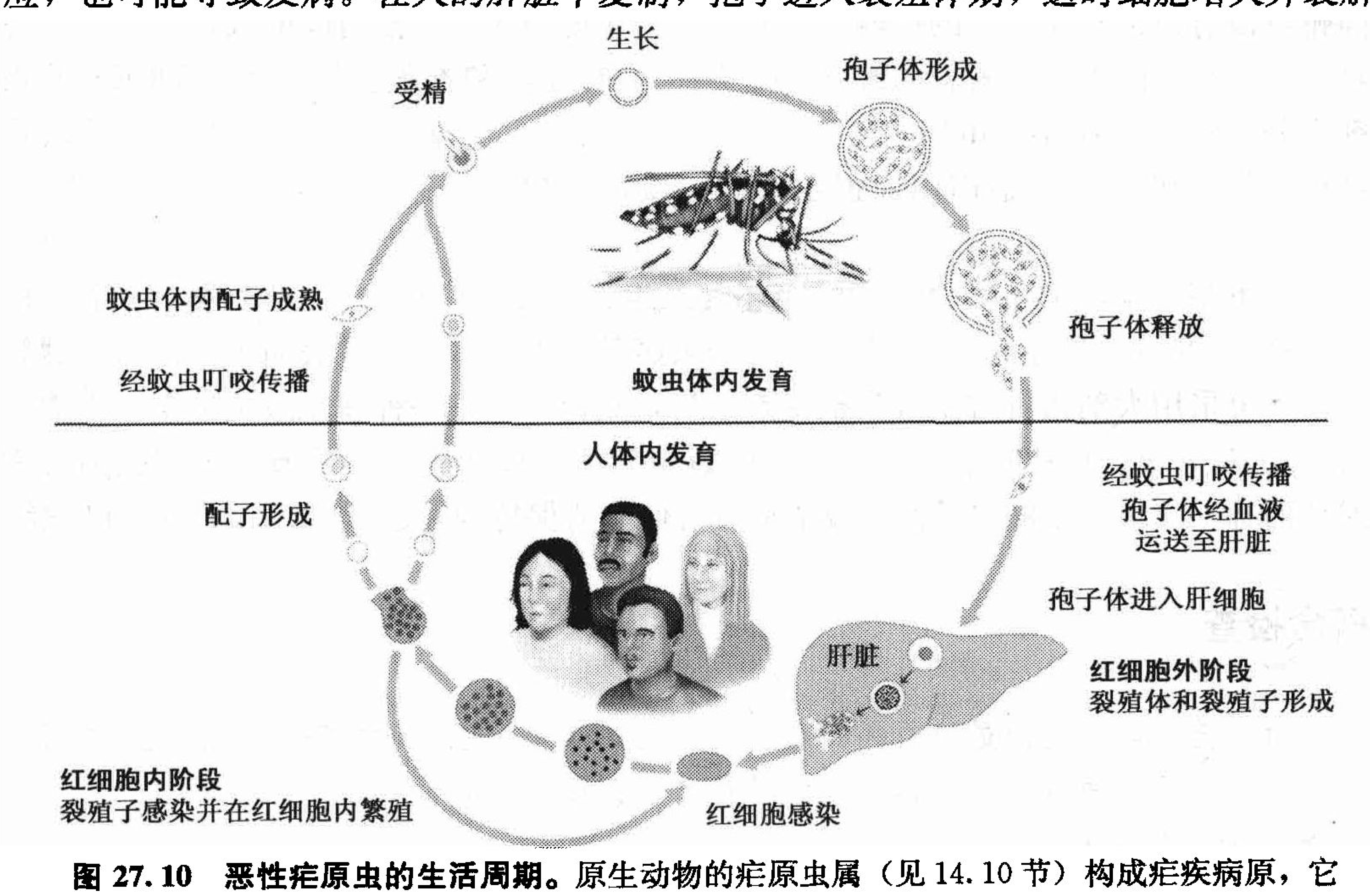


图 27.10 恶性疟原虫的生活周期。原生动物的疟原虫属（见14.10节）构成疟疾病原，它们的生活周期依赖于在恒温动物宿主和蚊子载体中的生长。原生动物在恒温动物宿主间的相互传播由蚊子的叮咬完成。

大量的小细胞称作裂殖子（merozoites），这些细胞从肝中释放到血液中。然后一些裂殖子感染红细胞。在红细胞中的周期与肝中一样。通常的间日疟疾每隔 48h 重复一次。在这个时期出现了典型的症状，冷颤后 40℃（104°F）高烧。当新的一代间日疟原虫细胞从红细胞中释放出来时就会出现冷颤。伴随着或冷或热还会出现呕吐和剧烈的头痛，但隐性症状和显性症状常交替出现。由于红细胞的丧失，所以疟疾常引起贫血和脾脏肿大。

并非所有从红细胞中释放的原生动物细胞都能感染其他的红细胞，那些不能感染的称为配子体（gametocyte），它们只对蚊子具有感染力。按蚊属（*Anopheles*）蚊子咬疟疾患者就会摄取配子体，它们在蚊子体内成熟形成配子（gamete）。两个配子融合形成合子，然后通过阿米巴运动移至昆虫肠的外壁并在那扩增形成一定数量的孢子体。然后孢子体释放，有一部分到达蚊子的唾液腺，从那里传播给其他的人，开始新一轮循环。

诊断和治疗

通过检查人的血涂片观察是否存在疟原虫感染红细胞（*Plasmodium*-infected erythrocyte）可确诊疟疾（图 27.11）。核酸荧光染色、核酸探针、聚合酶链反应（PCR），以及抗原检测方法都可以用来证实疟原虫（*Plasmodium*）感染，或用来区分不同种类疟原虫（*Plasmodium*）的感染。

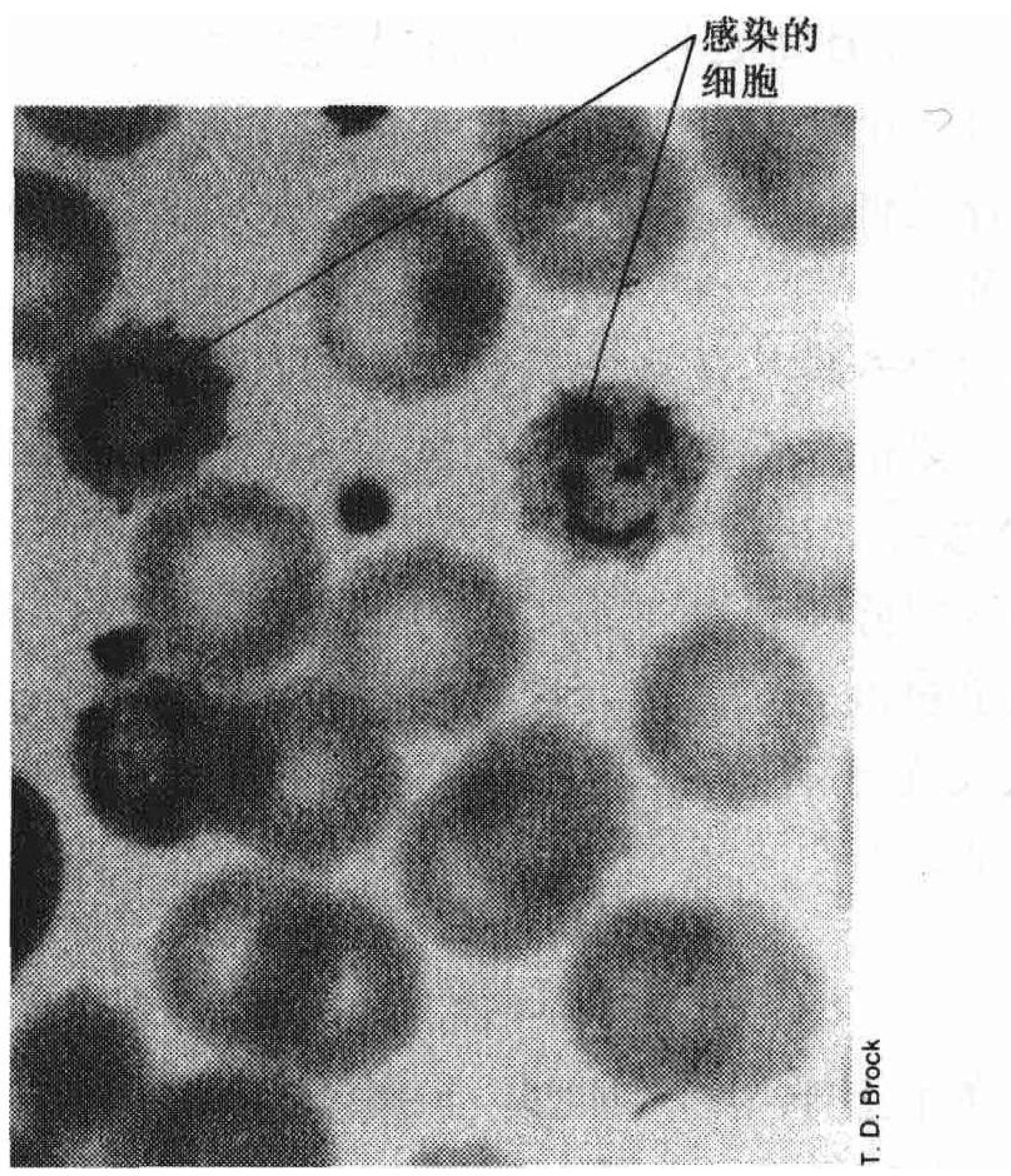


图 27.11　恶性疟原虫（*Plasmodium viva*）致病物在人血内的生长。

疟疾高发地区对此疾病的预防和治疗经常会用到氯喹（chloroquine）。氯喹是一种治疗红细胞内寄生虫的药物，但这种喹宁的衍生物并不能杀死红细胞以外的疟原虫。而伯氨喹可以有效地杀死孢子、裂殖子和胞外配子，所有用氯喹和伯氨喹同时治疗疟疾患者可以达到完全治愈。尽管有些人虽然已经接受治疗，但是疟疾可能还会在最初感染后

发生。还有一小部分存于肝内的孢子，可能免于喹宁类药物的攻击，并在几个月或几年后释放裂殖子重新引起疾病。

在世界上许多地区，疟原虫已经产生了对氯喹和伯氨喹的抗性，还有一些种对其他药物也产生了抗性。在一些有抗性病原体种的地区，使用一种混合了克莫和麦考的强力霉素可以有效地对疟疾进行预防和治疗。专家还利用青蒿素合成了一种新型抗疟疾药物，此药物包含可以形成辐射物的过氧化物混合物。这些抗寄生虫的混合物制剂在体外证实有效，目前正进行临床实验。

预防

抗疟疾药物造价高，只能对疟疾的预防和控制起到短期的效果，并且最终还会导致抗性病原株的产生，使其抗性越来越强。所以最有效的控制措施是阻断寄生虫的生活周期，这可以通过消除其必需寄主之一的按蚊（*Anopheles mosquito*）实现。

控制蚊子有两种可行的方法：①通过排干沼泽及其他类似繁殖地消除其栖息地；②使用杀虫剂消除蚊虫，随后对患者进行伯氨喹治疗，可破坏疟原虫的生活周期。20世纪30年代，美国在16个南部州挖了33 000英里长的水沟，消除了544 000英亩的蚊虫繁殖区。成千上万加仑的汽油洒向沼泽以减少蚊幼虫所需的氧。自从杀虫剂DDT发现以后（图19.49），使用化学方法控制蚊子的幼虫和成虫成为可能。在第二次世界大战期间，公共健康服务系统在战区组建了蚊虫控制小组。由于许多美军基地都设在南部地区，所以这个组织在美国同海外一样执行消除蚊虫的工作。1946年，美国发现有48 610例疟疾，于是国会建立了一个5年疟疾消除计划。在流行区，防治计划包括药物预防、对患者隔离治疗及使用DDT控制蚊虫的繁殖。1935年大约有4000人死于疟疾，而1952年只有25人死亡。

虽然疟疾在美国对公众健康的威胁日趋减小，但近年在纽约北部仍有些疟疾发生，极少数从疟疾高发区回来的士兵或移民者引发了阶段性的疟疾发病率增高。目前美国每年平均有1500例疟疾发生，5例死亡。

在世界另一些地区根除工作缓慢很多，但仍旧使用同样控制方法，且依然有效。毁坏蚊子生存环境、用杀虫剂驱蚊，以及使用药物来治疗或预防感染者仍然是控制疟疾的主要方法。一些疟疾疫苗正在研发中，包括合成肽疫苗、重组颗粒疫苗、DNA疫苗（见22.13节和31.8节）。

疟疾与人类进化

疟疾在非洲已存在了上千年。在西非，一些人对恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）引起的疟疾具有抗性与他们红细胞中血红蛋白（hemoglobin，Hb）改变有关。血红蛋白HbS与HbA两个相同分子亚基中的每个只有一个氨基酸差异，在HbS的β链中，中性氨基酸缬氨酸（valine）代替了HbA中的酸性氨基酸谷氨酸（glutamic acid）。含有HbS的红细胞对氧的亲和力下降，在低氧浓度情况下，HbS形成细长的聚合物，使红细胞从双凹穴形（图22.4）变成伸展的C形细胞，这种形状使得该细胞被称作镰状细胞（sickle cell）。有镰状细胞的人非常易于受氧浓度变化的影响而患镰状细胞贫血症（sickle cell anemia）。

HbS 杂合体有镰状细胞特征（sickle cell trait），但同时也提高了对疟疾的抵抗能力。HbS 杂合子也会形成镰状细胞，但是不像纯合子那么迅速。然而，生长在红细胞中的恶性疟原虫使得杂合子细胞比未感染的细胞更加易于形成镰状细胞。镰状细胞中的 HbS 聚合体破坏红细胞膜，使细胞中的钾流失。在这种流失钾的细胞中，恶性疟原虫无法生存。所以，有镰状细胞特征的人对疟疾具有抵抗力。

在某些疟疾高发的地中海地区，对于恶性疟原虫的抗性主要是由于红细胞缺失 6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PD）——一种细胞内抗氧化复合物。该酶的缺失导致了胞内的高氧化水平。就像生长中的恶性疟原虫可以在红细胞内产生过氧化氢一样，导致胞内的高氧化水平，损害寄生虫的膜并限制寄生虫生长。

在许多地中海人群中，各种基因的异常都会影响血红蛋白的产生和作用。这些都被归为地中海贫血症（thalassemia）。地中海贫血症在统计学上和地理上都与对疟疾的抵抗力具相关性，而且，也正像 G6PD 缺失一样，该病症也与红细胞内的抗氧化物水平降低相关。

HbS、G6PD 和地中海贫血症均因基因的突变导致红细胞缺陷和抗氧化物合成障碍，但由于因此获得对疟疾的抗性而在人群中被选择。

疟原虫影响人类进化的另一个例子是主要组织相容性复合物（MHC）和免疫系统（见 23.3 节和 23.4 节）。前面讨论过，MHC Ⅰ类和 MHC Ⅱ类分子呈递抗原给 T 细胞从而激发免疫反应。在易感疟疾的赤道西非地区，人们通常具有特异 MHC Ⅰ基因和一套特殊的 MHC Ⅱ类基因，它们是从 100 种不同基因和不同套基因中筛选出的。所以这种特异选择的基因在西非人群中比在其他人群中要普遍。表达这些基因的人与具有 HbS 的人一样有抗致命性疟原虫（*Plasmodium* spp.）感染的能力。这些特殊的 MHC 蛋白特异性地递呈疟原虫的某些抗原而产生对恶性疟原虫属感染的保护性抵抗。正像变异的血红蛋白获得选择一样，寄生虫也是对宿主存活起重要作用的 MHC 基因的选择因素之一。具有这些抗疟 MHC 基因的个体具有一定的生存优势，因而更有可能存活并将其抗性基因传给后代。

因此疟疾在某些方面成为人类进化的一个选择因素。其他病原体，如结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuuberculosis*）（肺结核，见 26.5 节）和鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）（鼠疫，见 27.7 节）也可能促进了人类进化，只是没有获得像疟疾一样清楚的证据。

概念检查

疟疾是一种由蚊虫广泛传播的，主要发生在热带和亚热带地区的疾病。它是发展中国家人民发病和致死的主要原因，并与抗性基因的进化有关。关注公众健康和使用化疗手段可以防止这种疾病。

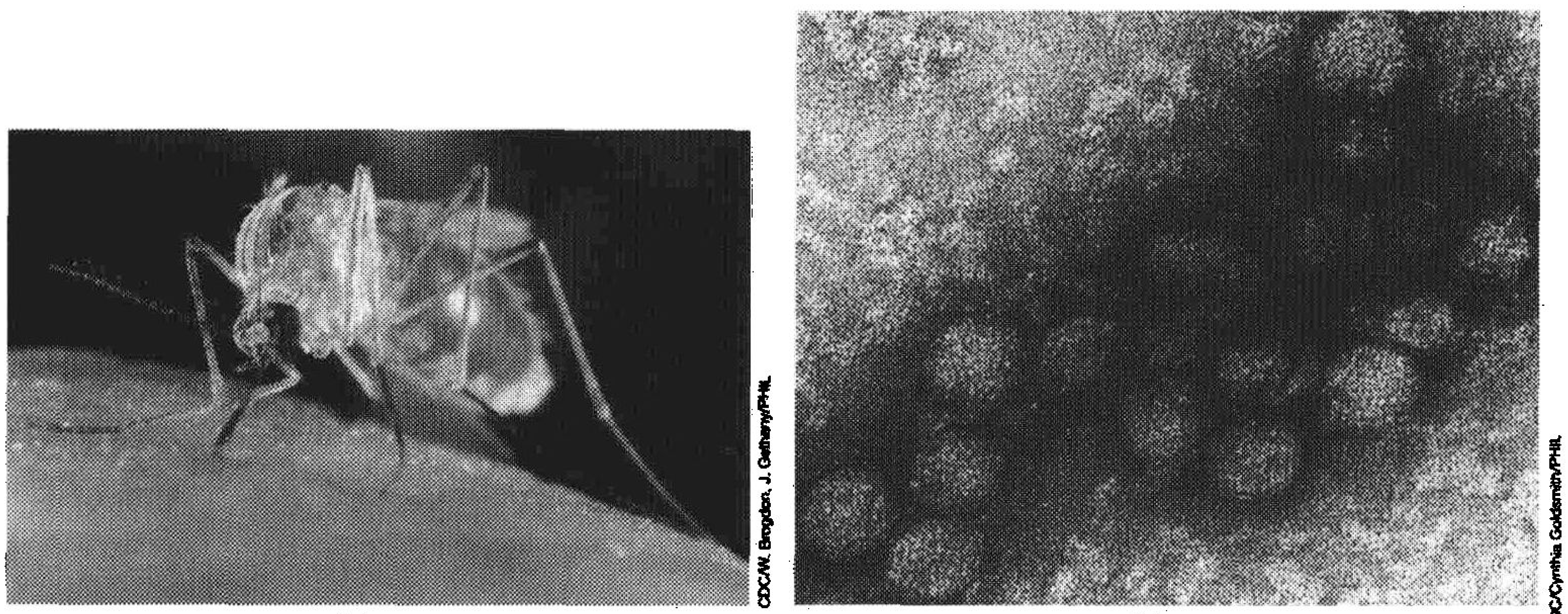
◆ 疟原虫种的天然宿主是什么？如何防止疟疾？

◆ 复习疟疾抗性的遗传机制。为什么抗疟疾的基因没有在所有人群中出现？

27.6 西尼罗病毒

西尼罗病毒（West Nile virus，WNV）引发西尼罗热（West Nile fever），西尼罗

热是一种由蚊虫叮咬而迅速在人类中传播的疾病。西尼罗病毒是黄病毒家族中的一员，它由囊膜、对称的二十面体衣壳和大约 11 000 核苷酸的正单链 RNA 组成（见 16.8 节）。二十面体的直径为 40～60nm，这种病毒可以侵袭其恒温动物宿主的神经系统（图 27.12）。



(a) (b)

图 27.12 西尼罗病毒。（a）图中所示系吸血后的致倦库蚊（*Culex quinque-fasciatus*），它是一种西尼罗病毒的载体。（b）西尼罗病毒的电镜照片，二十面体毒粒的直径为 40～60nm。

流行病学

1937 年，在乌干达第一次证实西尼罗病毒可以感染人类。到了 20 世纪 50 年代，这种病毒已经传播到了埃及和以色列。在 20 世纪 90 年代，西尼罗病毒在许多非洲和欧洲国家中的马、鸟和人群中肆虐。1999 年，美国第一次报道了这种病的发生，且最开始发生的区域集中于东北部纽约附近。1999～2001 年，已证实的人类西尼罗热有 148 例，其中 18 人死亡。由于这种病毒具有季节性和靠蚊虫传播的特性，到 2002 年这种疾病已经从东海岸转移到了中西部，最高的发病记录是伊利诺伊州的 884 例，全国 4156 例。到 2003 年，已有 9186 起被证实的病例，主要集中于中西部和西部。科罗拉多州是发病率最高的地区，有 2477 例（图 27.13)。伊利诺伊州仅有 53 例。由于对西尼罗病毒的鉴定和检测技术的进步（见下文），许多甚至只表现轻微症状的个体感染也可以被诊断出来，因而西尼罗病毒感染引起的死亡人数从 2002 年的 284 例下降到了 2003 年的 231 例，而 2003 年的确诊病例数是 2002 年的 2 倍以上。

西尼罗病毒一般会引起鸟类的活跃疾病，通过感染病毒的蚊虫叮咬而传染给易感宿主。已知很多种蚊子是传播载体，至少 130 种鸟类是宿主。感染鸟类发生病毒血症可持续 1～4 天，存活下来的个体可以获得终生免疫力。吸了病鸟血液的蚊子便被感染，然后继续感染其他易受感染鸟类，持续这个循环。某一区域内的鸟类宿主死亡或产生免疫力会引起这个区域的发病率下降。然而，蚊子可将这种疾病传播到另一区域的易感宿主中，在陆地范围内形成浪潮般的流行病传播模式。2004 年的数据表明这种流行病已经传播到西海岸和西南部。2004 年，在加利福尼亚和亚利桑那出现了人类患病的最高纪录，而在中西部和科罗拉多州的病例却显著减少。在今后的一些年内，这种疾病不

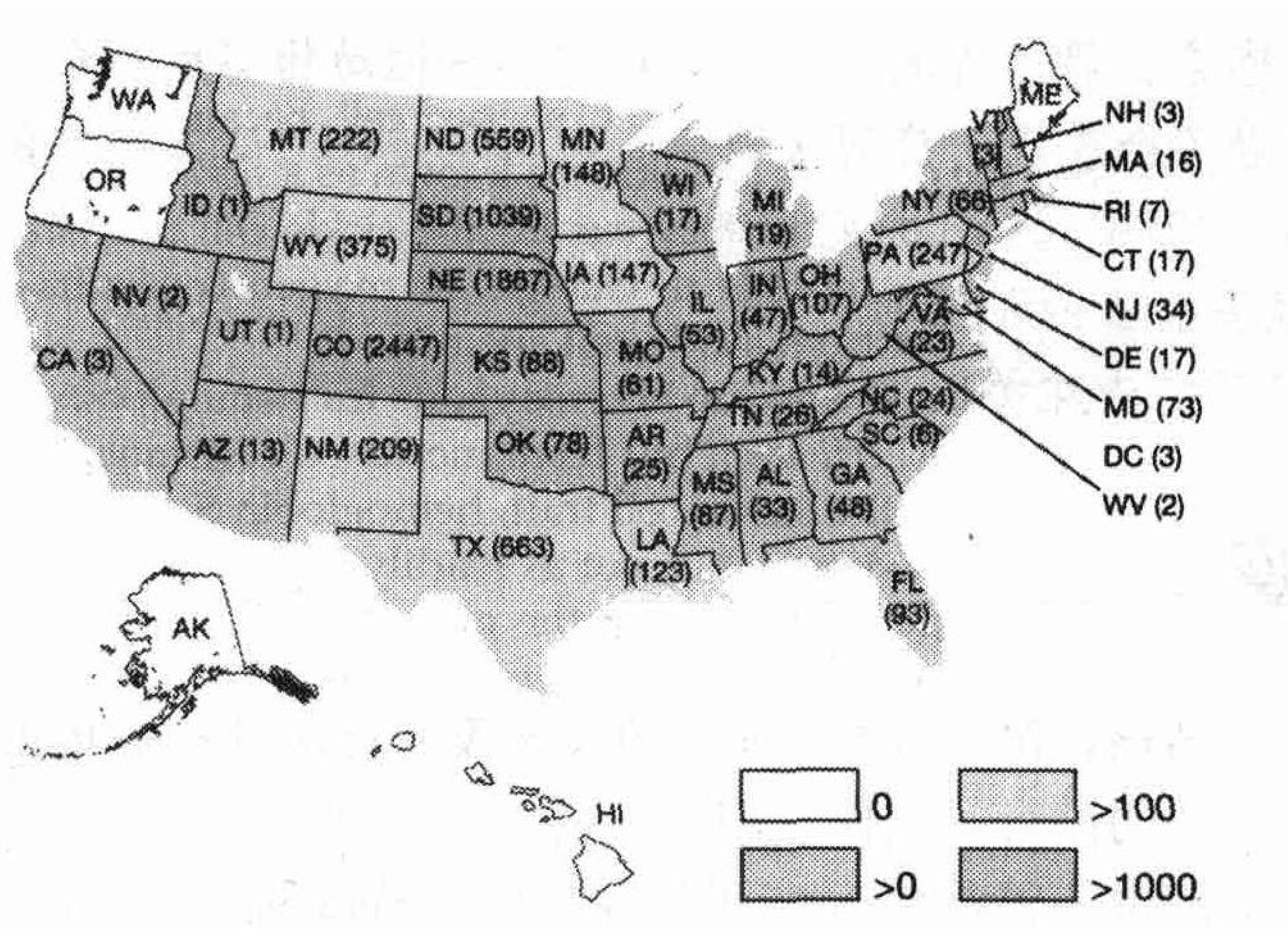


图 27.13　2003 年西尼罗病毒在美国流行情况。病毒引起的人类病例共 9186 例，其中致死 231 例。从 1999 年开始至 2003 年期间集中发病地区开始由东海岸经由中西部地区扩展到西部地区。每年病例的高发区伴随病毒感染新的易感人群而移动。数据来自美国疾病预防控制中心。

会再成为美国邻近国家的流行病，西尼罗病毒会成为北美鸟类群体中的一种地方性病原体。

人类和其他动物是最终宿主，因为他们不会患能感染蚊子的病毒血症。已诊断的感染者死亡率在 2%～3%，而马的死亡率可达 40%。大多数人类感染不表现什么症状或是症状极其轻微。约 20%感染者发生西尼罗热，这是一种轻微症状的疾病，潜伏期 3～14 天，发病 3～6 天。发烧可能还会伴随头痛、呕吐、肌痛、斑疹、淋巴结肿大和乏力。不到 1%的感染者会发展成严重的神经性疾病如西尼罗脑炎或脑膜炎。50 岁以上的成人神经系统并发症的发生率比其他人群高一些。西尼罗病毒病的确诊可根据和其后患者血清或脑脊液中的西尼罗病毒抗体 ELISA 检测阳性结果（见 24.10 节）。

预防和控制

像圣路易斯脑炎病毒和其他经蚊子传播引起脑炎的病毒（图 25.3）一样，西尼罗病毒在美国的传播是季节性的，且依赖于接触蚊虫。控制西尼罗病毒传播的主要方法就是减少与病毒载体的接触。例如，避免接触蚊虫生存环境，在傍晚和天黑（蚊子活动的主要时间）时待在室内，穿适当的防蚊虫衣物，以及使用含有 DEET 的驱蚊剂，就像对待莱姆病那样（见 27.4 节）。在群体水平上，通过消灭蚊虫生存环境和采用适当的杀虫剂来控制蚊虫载体的数量是重要的控制西尼罗病毒的公众健康措施。虽然已经开始了疫苗研发，但现在还没有有效的人类疫苗。兽用疫苗已在使用，但是效果还未知。像其他病毒性疾病一样，该病的治疗也主要采用休息、吃流食、减轻发烧和疼痛症状等支持性疗法。目前还没有抗病毒的特效药物。

概念检查

西尼罗病毒热是一种新发的蚊子传播的疾病。这种疾病的天然循环途径是由感染蚊

子叮咬导致鸟类感染。偶然情况下，人类和其他脊椎动物会成为病毒的最终宿主。虽然大多数人类感染者不会表现病症而未被诊断，但是经诊断的感染病例可由于发生并发症（如脑炎和脑膜炎）而引起3%的死亡率。

◆ 确定西尼罗病毒的载体和宿主。

◆ 描述西尼罗病毒在美国自1999年以来的发展过程。

27.7 鼠疫

除了疟疾和肺结核，鼠疫（plague）的大规模流行比其他的传染病造成更多人类的死亡，鼠疫在中世纪的流行，致使欧洲人口的25%～33%死亡。

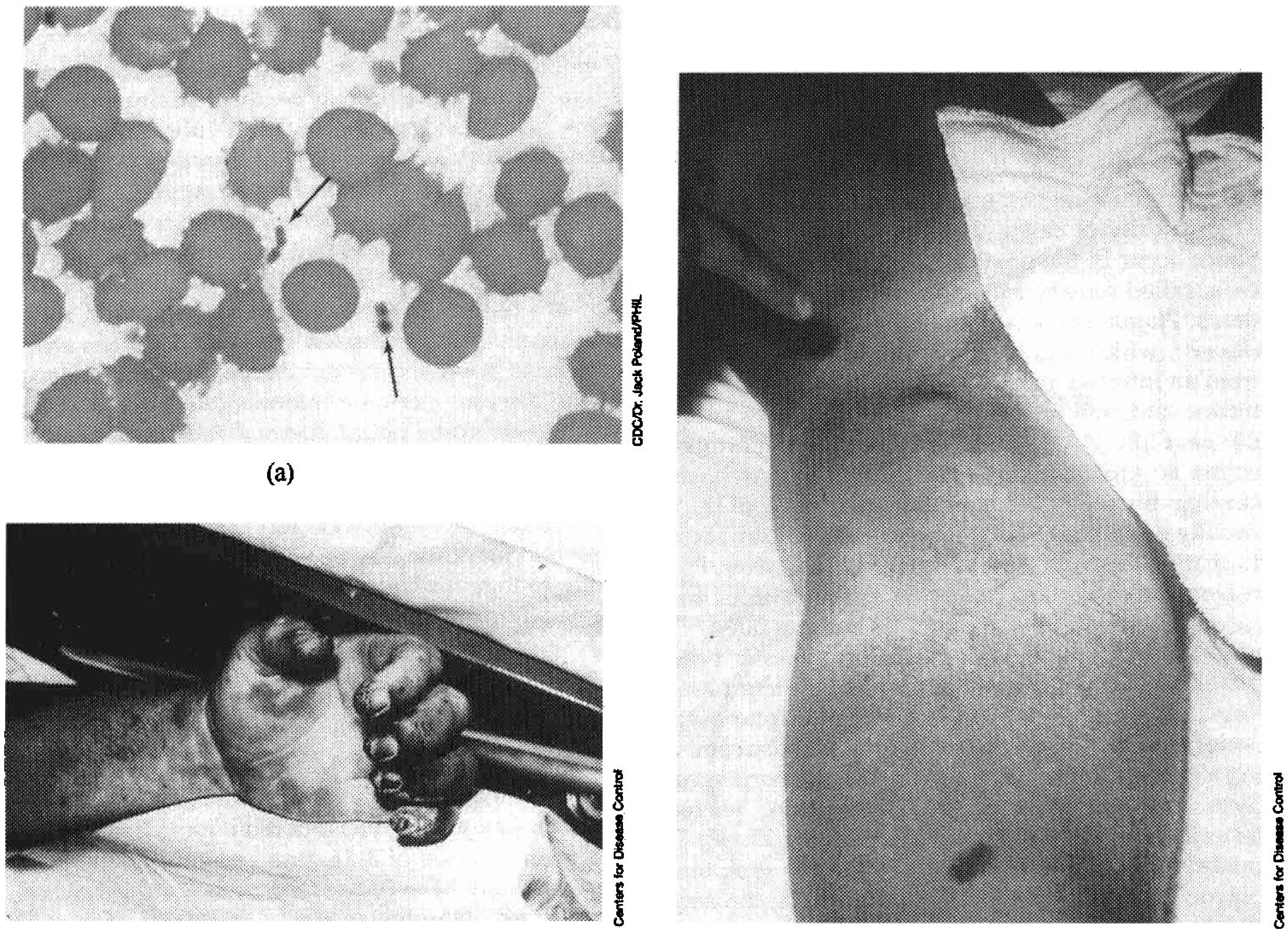
鼠疫是由肠道菌中一种称作鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）的革兰氏阴性兼性好氧杆菌引起的（见12.11节）（图27.14）。鼠疫是家畜和野生的啮齿类动物的自然疾病，但老鼠是其主要的宿主。人类仅仅是偶然宿主，且不会将这种病继续传播下去。跳蚤是直接宿主，并可作为载体，使鼠疫在哺乳动物宿主间传播（图27.15）。大多数患病的老鼠在出现症状以后很快就死亡，但有极少的一部分发展为慢性感染，并成为致病性的鼠疫耶尔森氏菌的持续的传染源。

流行病学

美国大多数人类的鼠疫病都发生在西南各州，在那里这种被称为森林鼠疫（sylvatic plague）的病，主要在野生啮齿类动物中地方性流行。鼠疫是通过大鼠上的跳蚤（*Xenopsylla cheopis*）来传播的。跳蚤吮吸被感染动物的血液时将鼠疫耶尔森氏菌摄入体内。这些细菌在跳蚤的肠道内扩增并通过下一次的叮咬传给健康的动物。由于这种疾病的传播，大鼠死亡率非常高，所以感染的跳蚤寻找包括人在内的新宿主。一旦进入人体，鼠疫耶尔森氏菌就会移动到淋巴结（buboes），在那里形成肿块称为腹股沟腺炎。正是因为这个原因，这种疾病常称为淋巴腺鼠疫（bubonic plague）(图27.14b)。腹股沟腺炎中充满了鼠疫耶尔森氏菌，该菌表面特殊的荚膜可以抵抗吞噬（见22.2节）。在外围淋巴结内次级腹股沟腺炎形成，最后鼠疫耶尔森氏菌进入血液，导致全身性的败血症，多处出血在皮肤上形成暗斑（图27.14c）。如在败血症出现前没加以治疗，鼠疫的症状如淋巴结肿痛、衰竭、休克和精神错乱就会出现，通常在3～5天内死亡（图27.15）。

病理学

鼠疫的致病机制现在还不清楚，但已知鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）可以产生许多包括毒素在内的抗原特异性分子，无疑对疾病的发展有作用。鼠疫耶尔森氏菌细胞壁的v和w抗原是脂蛋白复合物，可以抵抗吞噬，还存在其他的膜蛋白。鼠疫耶尔森氏菌的毒力株产生一种外毒素，因该毒素对鼠极毒，所以又称为鼠毒素（murine loxin）。鼠毒素是一种呼吸抑制剂，它可以在辅酶Q处阻断线粒体的电子传递反应（见5.11节）。虽然鼠毒素是如何引起人类鼠疫还不清楚（因为鼠毒素只对某些动物具有强烈的毒性而对其他动物无作用），但它可引起鼠全身性休克、肝损伤和呼吸衰竭。这些



(a)　(c)　(b)

图 27.14　人患鼠疫。(a) 鼠疫耶尔森氏菌，引起鼠疫的病原体是一种革兰氏阴性菌，长约 2μm，直径约 1μm。血液涂片中的这种生物（箭头处）呈现出特征性的双泡染色模式。(b) 腹股沟处形成的淋巴。(c) 鼠疫患者手部皮肤上的坏疽和凹陷。淋巴腺鼠疫如果在发病早期被诊断出可以通过使用抗生素来控制。鼠疫性肺炎和鼠疫性败血症用抗生素不能治疗，所以致死率很高。

症状与人类的鼠疫非常相似。鼠疫耶尔森氏菌也可产生一种具较高免疫原性的内毒素(endotoxin)，它对疾病的发展也起到一定作用。

淋巴腺鼠疫患者，如果直接吸入了鼠疫耶尔森氏菌菌体或菌体到达肺部就会引起肺鼠疫（pneumonic plague)，其早期一般无症状，直到疾病的最后一两天出现大量血痰。如果不加以治疗最多能活 2 天。可以想像肺鼠疫是一种易接触传染的疾病，如果患者没有立即被隔离，则可通过呼吸道迅速传播。鼠疫败血症（septicemic plague）是指鼠疫耶尔森氏菌通过血流快速传播而不形成腹股沟腺炎，通常未诊断就已经死亡。

治疗和控制

鼠疫如果及时诊断就可治疗。可以通过链霉素和庆大霉素肠外给药来治疗鼠疫耶尔森氏菌的感染，也可以采取强力霉素、环丙沙星或者氯霉素肠内给药。如果立即加以治疗，淋巴腺鼠疫（bubonic plague）的致死率会降低到其感染者的 1%～5%。肺鼠疫和鼠疫败血症都可以治疗，但它们发展得太快，若晚期才开始抗生素治疗就来不及了。虽然这是一种杀伤性很大的疾病，但自 1990 年以来美国平均每年只有 97 例鼠疫报道。不

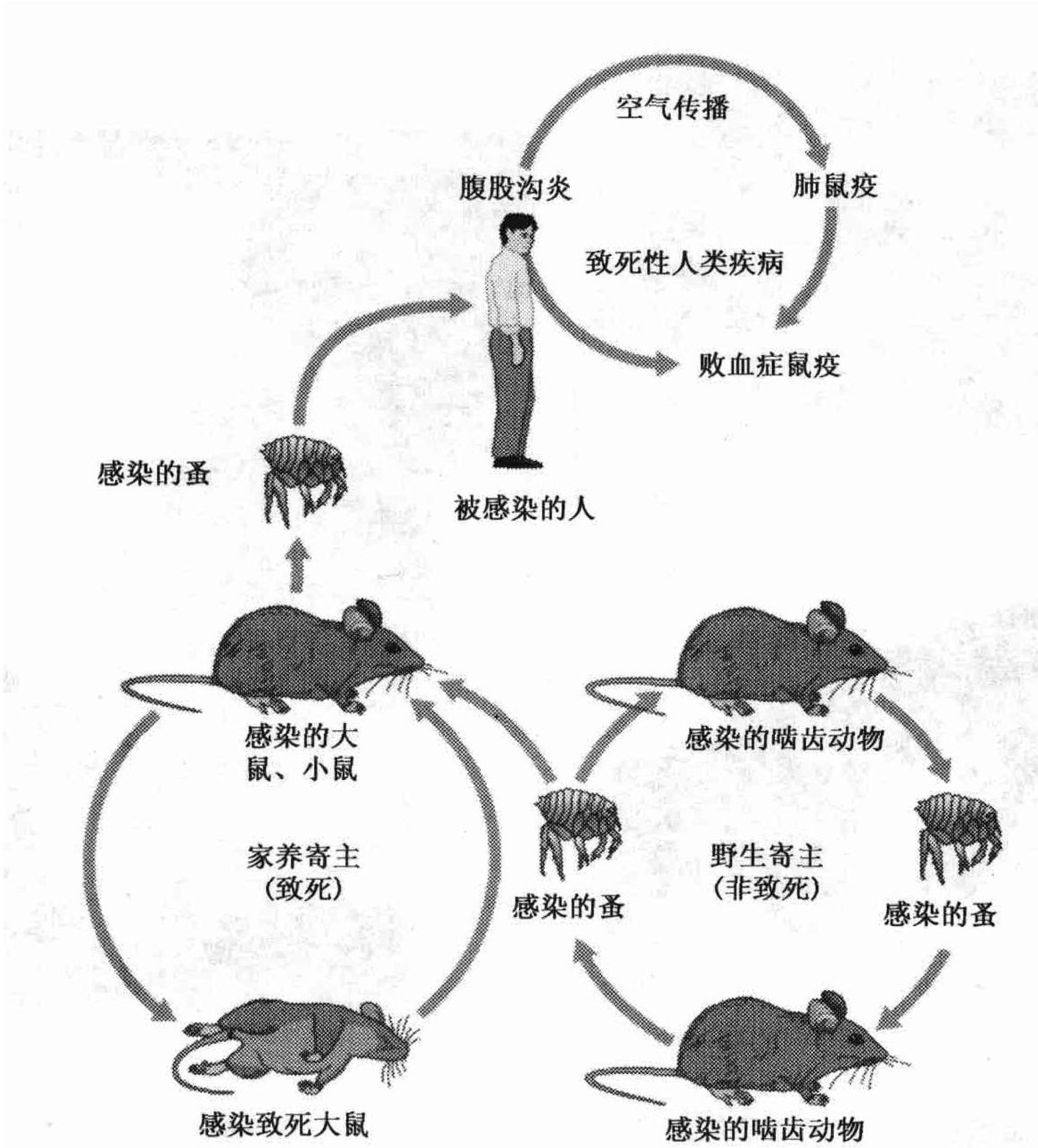


图 27.15 由鼠疫耶尔森氏菌引起的鼠疫的流行病学。大多数啮齿动物中的鼠疫一般是一种温和性的、自限性的感染。老鼠和人患鼠疫有更高的致死率。感染的跳蚤抛弃死亡宿主，继续寻找新的宿主，如人类。

幸的是，会有 8 个人死亡。就全球而言每年发现的病例不到 1500 例，死亡人数不足 300。鼠疫耶尔森氏菌可以作为生物武器（见 25.12 节），此时可以口服强力霉素和环丙沙星加以预防。

对于感染动物，载体和人群的监控已经很好地达到了控制鼠疫的目标。一经鉴定，被鼠疫感染的动物群体会被全部消灭。公共健康水平的提高，对啮齿动物数量的控制无疑大大降低了人类接触鼠疫的可能性。

概念检查

鼠疫大多数发生在那些与带有鼠疫耶尔森氏菌的鼠群接触的个体中感染，常导致立即死亡，但局部感染可以用抗生素加以治疗。

◆ 淋巴腺鼠疫、肺鼠疫和鼠疫败血症的区别是什么？

◆ 鼠疫的昆虫宿主是什么？鼠疫的天然宿主是什么，如何治疗？

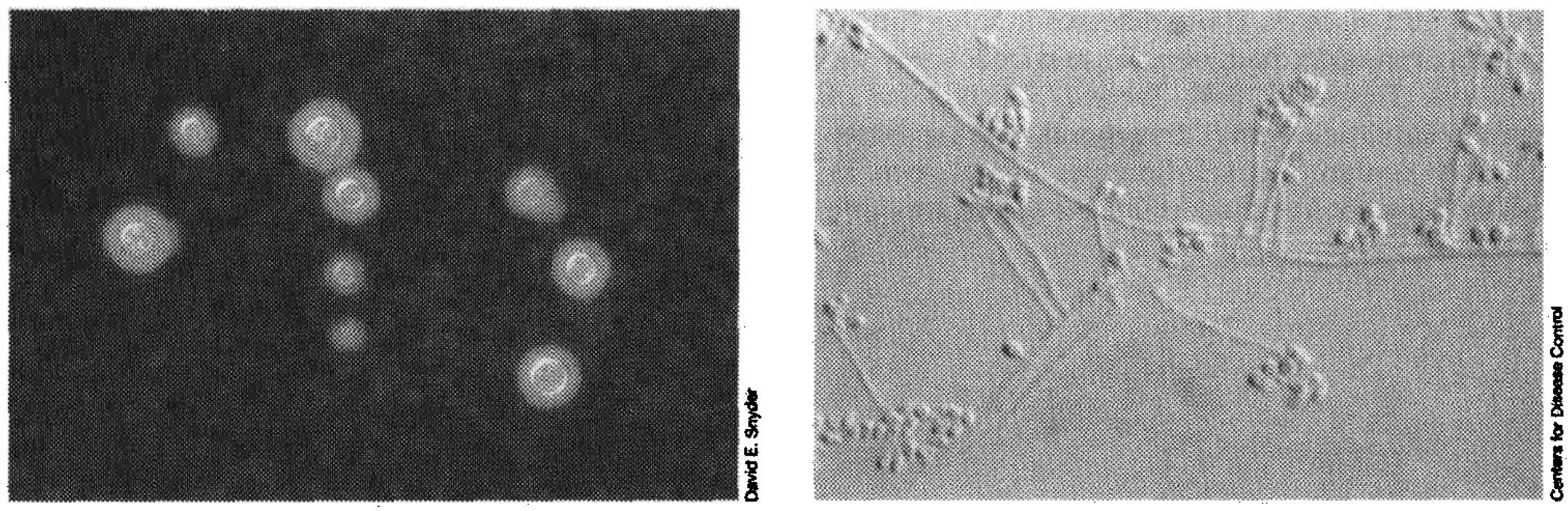
Ⅲ 土壤传播的疾病

这里我们来讨论一些通过土壤传播的疾病。真菌是常见的也是世界范围内遍在的土壤微生物，其中一些可能是病原体。一些细菌也是重要的土壤传播的病原体。与很多人类之间传播或载体传播的病原体相比，土壤传播的病原体更具偶然性，而且对于偶然感染的宿主也没有生命过程的依宿性。土壤是这些病原体无限制的宿主，所以这些病原体无法消灭。

27.8 病原性真菌

真菌几乎可以在所有的生态环境中生长，但是在自然界中常见的是自由生活的腐生菌（见 14.12 节）。某些真菌是机会致病菌。

真菌包括真核生物，如我们常说的酵母（yeast）和霉菌（molds）。酵母一般以单细胞形式生长（图 27.16a）；霉菌以分支形成菌丝（hyphae）的形式生长（图 27.16b）。我们在 14.12 节讨论了这些生物的分类和生物多样性。幸运的是，大多数真菌对人类无害。只有 50 种左右会引起疾病，而且严重的真菌感染的总发病率相当低，不过浅表性真菌感染却相当常见。



(a)　　　　(b)

图 27.16　病原性真菌的典型形态。（a）新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）酵母的形态，经印度墨水染色显示荚膜。细胞直径为 4～20μm。（b）申氏孢子丝菌（*Sporothrix schenckii*）的分支或菌丝，霉菌的特征。圆形担孢子的直径约为 2μm。关于真菌的讨论见 14.12 节。

流行病学

真菌致病主要有三个机制。首先，当人体与某些真菌抗原相接触后，会引起免疫应答从而造成过敏反应（超敏反应）（见 22.15 节）。无论是生活在宿主上还是环境中的真菌，当再次与宿主接触时就会产生过敏症状。例如，曲霉属（*Aspergillus* spp.）（图 14.31）是自然界中常见的腐生生物，是一种潜在的而且非常常见的过敏原，经常会引起哮喘和其他过敏性反应；曲霉还有其他的致病机制。

真菌致病的第二种机制是产生真菌毒素（mycotoxins），包括大量各种各样的真菌

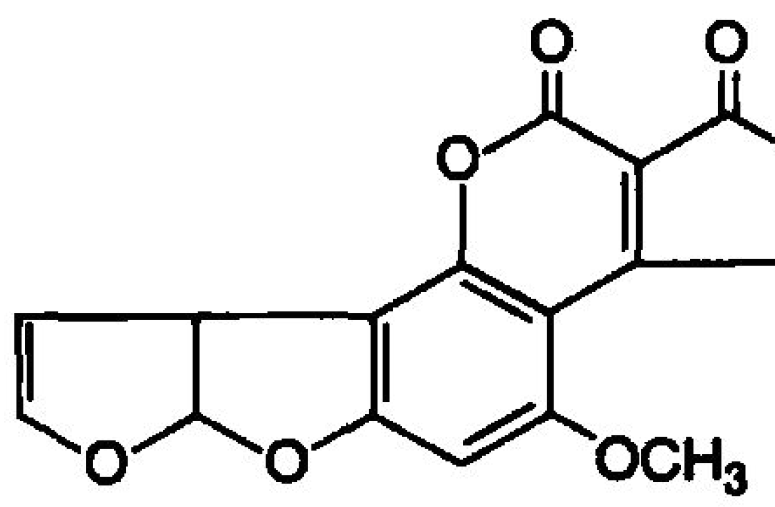


图 27.17 黄曲霉毒素 B1 的结构。 这种毒素是一类由黄曲霉（*Aspergillus flavus*）产生的化合物。

外毒素。最熟知的真菌毒素是由黄曲霉（*Aspergillus flavus*）产生的。黄曲霉经常生长在没有妥善保存的食物如谷物上。由黄曲霉产生的毒素称为黄曲霉毒素（aflatoxins）（图 27.17）。黄曲霉毒素具有很高的毒性，它可以诱使动物发生肿瘤，特别是那些以腐烂的谷物为生的鸟。黄曲霉毒素对于人类疾病的直接作用还不清楚。

第三种致病机制是通过传染，也称作真菌病（mycoses）。

真菌病

真菌在体内或体表的生长被称为真菌病。真菌病的严重程度相差很大，可以是无害的轻度疾病也可以是严重威胁人类生命的疾病。

真菌病可以分为三类。第一类是浅表性的真菌病（superficial mycoses）。这种病为真菌在皮肤、头发和指甲上形成集落，并只感染表层（图 27.18a）。表 27.2 列举了一些常见的浅表性真菌病。一般来说，这些疾病都是良性的而且可以自控。有些病如足部的毛癣菌（*Trichophyton*）感染十分常见，它的传播可以通过与患者的接触，也可以是通过接触污染物的表面如浴盆或淋浴，以及其他被污染的公用设施如毛巾或床单。对于严重疾病的治疗常在局部使用抑霉唑硝酸盐或灰黄霉素，灰黄霉素也可用于口服，它一旦进入血液就会到达皮肤，那里阻止在的真菌生长。

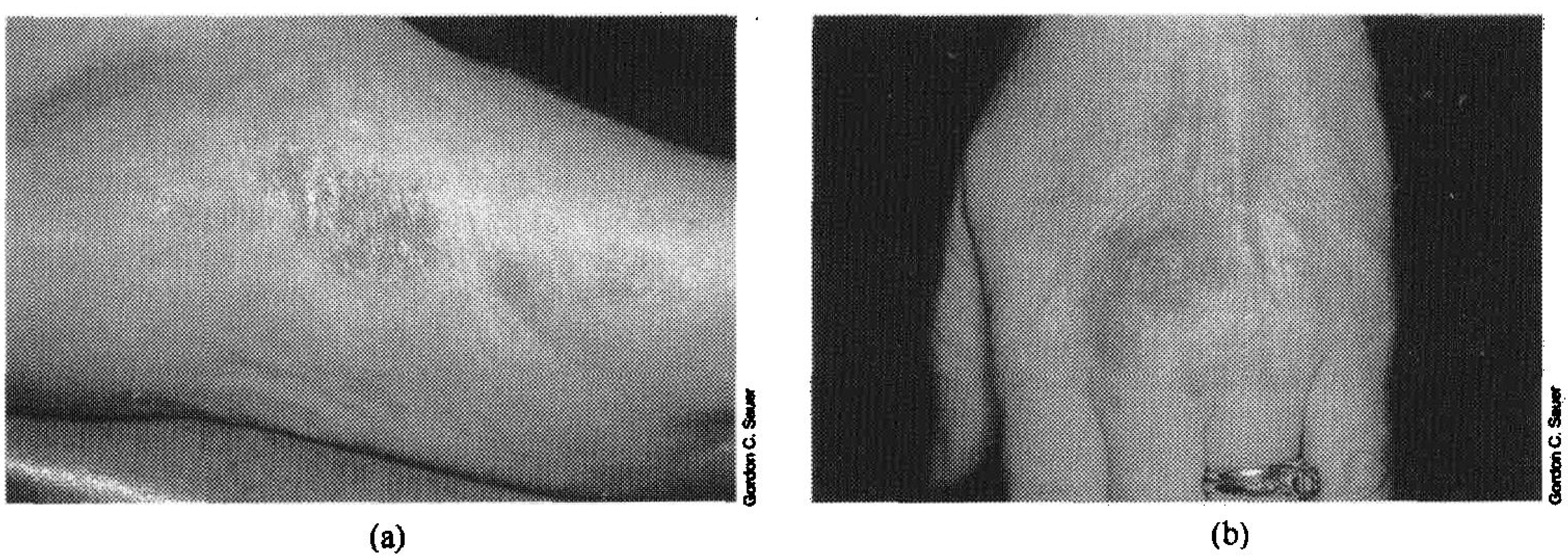


图 27.18 真菌感染。（a）足部的浅表性真菌病（即俗称香港脚），这是由红色毛癣菌（*Trichophyton rubrum*）感染引起的。（b）孢子丝菌病（sporotrichosis），由申氏孢子丝菌的皮下感染引起。

第二类是皮下真菌病（subcutaneous mycoses），主要是另一些真菌群（表 27.2）引起皮肤深层的感染（图 27.18b）。其中有一种是孢子丝菌病（sporotrichosis），它是耕作者、矿工及其他与土壤相接触工人的职业病。这种致病有机体是木材和土壤中普遍存在的腐生物。损伤常由真菌感染了小伤口或擦伤引起。申氏孢子丝菌（*Sporothrix schenckii*）易从伤口处分离并在体外培养，可以通过口服钾或酮康唑加以治疗。

表 27.2　一些病原真菌和它们引起的疾病

疾病	病原体	主要病灶
浅表性真菌病 (Superficial mycoses) (皮癣 dermatomycoses)		
癣菌病 (Ringworm)	小孢子菌属 (*Microsporum*)	小孩的头皮
黄鳞癣 (Favus)	毛癣菌属 (*Trichophyton*)	头皮
香港脚 (Athlete's foot)	表皮癣菌属 (*Epidermophyton*)，毛癣菌属 (*Trichohyton*)	脚趾之间，皮肤
股癣 (Jock itch)	毛癣菌属 (*Trichophyton*)，表皮癣菌属 (*Epidermophyton*)	生殖器区域
皮下真菌病 (Subcutaneous mycoses)		
孢子丝菌病 (Sporotrichosis)	申氏孢子丝菌 (*Sporothrix schenckill*)	胳膊，手，腿，脚
着色真菌病 (Chromoblastomycosis)	几个真菌属	
系统性真菌病 (Systemic mycoses)		
隐球菌病 (Cryptococcosis)[a]	新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)	肺，脑膜
球孢子菌病 (Coccidioidomycisis)[a]	粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)	肺
组织胞浆菌病 (Histoplamosis)[a]	夹膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)	肺
芽生菌病 (Blastomysosis)[a]	皮炎芽酵母 (*Blastomyces dermatitidis*)	肺，皮肤
念珠菌病 (Candidiasis)[a]	白假丝酵母 (*Candida albicans*)	口腔，肠道

a. 认为可能的病原体并且可能和 AIDS 的致病机制有关（见 26.14 节）。

系统性真菌病（systemic mycoses）是第三类、也是最严重的真菌感染性疾病，是真菌在机体内部器官上的生长。它们可以再分为原发感染和继发感染。原发感染指真菌病原体直接感染正常健康个体，继发感染指病原体感染那些接受抗生素治疗或免疫力受抑制的个体。在美国最流行的原发真菌感染是网状内皮细胞真菌病（histoplasmosis），它是由荚膜组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*）和粗球孢子菌（*Coccidiades immitis*）引起的球孢子菌病。这两种有机体通常都生活在土壤中，均引起呼吸道疾病。当宿主通过呼吸而吸入空气中的孢子时，它们就会在肺内萌发和生长。网状内皮细胞真菌病主要发生在美国中西部地区的山村，特别是俄亥俄和密西西比流域。大多数疾病都非常温和，常与其他常见的呼吸道疾病相混淆。球孢子菌疾病只限于美国西南部的沙漠地区。真菌生活在沙漠土壤中，孢子则散布在那些被吸入的干燥颗粒中。在美国西南部某些地区，尽管大多数个体都不表现病症，但确有 80%的人都被其感染。

有些真菌感染包括网状内皮细胞真菌病和球孢子菌病非常严重，它们尤其影响着那些由于患获得性免疫缺陷综合征（acquired immune deficiency syndrome 或 acquired immunodeficiency syndrome，AIDS）或使用免疫抑制类药物而导致免疫系统衰弱的人（见 26.14 节），这些就是继发真菌病。因为正常的个体都不会患病或通常症状也不那么严重。表 27.2 列举了继发真菌病的病原体，这些真菌都被称为机会性病原体，因为它们只能引起那些防御系统受损个体的严重感染（特别是 AIDS 患者，见 26.14 节）。

治疗和控制

有效防治全身性真菌感染的化疗方法是很难得到（见 20.11 节）。大多数抑制真菌

的抗生素对于其他真核生物也是有害，包括人类。最有效的抗生素之一——两性霉素 B 被广泛用于治疗人类的全身性真菌感染，但它有严重的副作用，如发生肾中毒。

把真菌病原体从环境中根除是不现实的。就像许多常见的病原体一样，对于真菌生长的控制十分困难，这是因为它的宿主是不被限制的。虽然接触真菌不能避免，但是可以通过在特定区域内减少污染和过滤空气来降低感染的可能性。

概念检查

一些土壤中生长的真菌可引起人类疾病。体表真菌病、皮下真菌病和系统性真菌病是难以控制的，这是由特定的抗真菌药物的匮乏和病原体的特异性决定的。真菌感染会引起严重的系统性疾病，尤其是在免疫力低下个体如 AIDS 患者中表现更为明显。

- 描述体表真菌病、皮下真菌病和系统性真菌病。
- 区分原发和继发真菌疾病。

27.9 破伤风

破伤风（tetanus）是一种严重的、致死率很高的疾病。虽然可以通过免疫来预防破伤风（见 22.13 节），但是在过去 10 年中美国仍然有 473 人患破伤风，其中 68 人死亡。

生物学和流行病学特征

破伤风是由破伤风梭菌（*Clostridium tetani*）产生的外毒素所引起的，这是一种由可变厌氧内生孢子形成的杆状细菌（见 12.20 节）。破伤风梭菌的天然宿主是土壤，偶尔也会在哺乳动物肠道中发现这种细菌和其他种梭菌。破伤风梭菌一般沿着与土壤接触的伤口、常常是很深的伤口进入体内。伤口内的无氧状态给内生孢子和破伤风梭菌提供了生长条件。破伤风梭菌会产生一种毒性很强的外毒素，即破伤风毒素（tetanus toxin）。这种细菌是非侵入性的，所以只有当毒素直接作用于宿主细胞时才会引起破伤风。发病时间不固定，可能是 4 天到几周，这取决于受伤期间体内产生的内生孢子数目。破伤风不能在人群中传播。

病理学特征

我们已经分析了破伤风毒素在细胞和分子水平上的作用（见 21.10 节）。这种毒素直接影响神经系统中抑制信号分子的释放。这些抑制信号控制肌肉收缩过程中的“休息”阶段，毒素作用的结果是表现为通常被称“牙关紧闭”（lockjaw）的自主肌肉僵硬性瘫痪，这种病最初发现于颌和脸部（图 27.19）。自主肌肉僵硬性瘫痪引起呼吸障碍，常常会导致死亡，且死亡率很高（过去 10 年在美国是 15%）。

诊断、控制、预防和治疗

对破伤风的诊断基于伤口是否暴露、临床症状，以及在极少数患者血液或组织中发

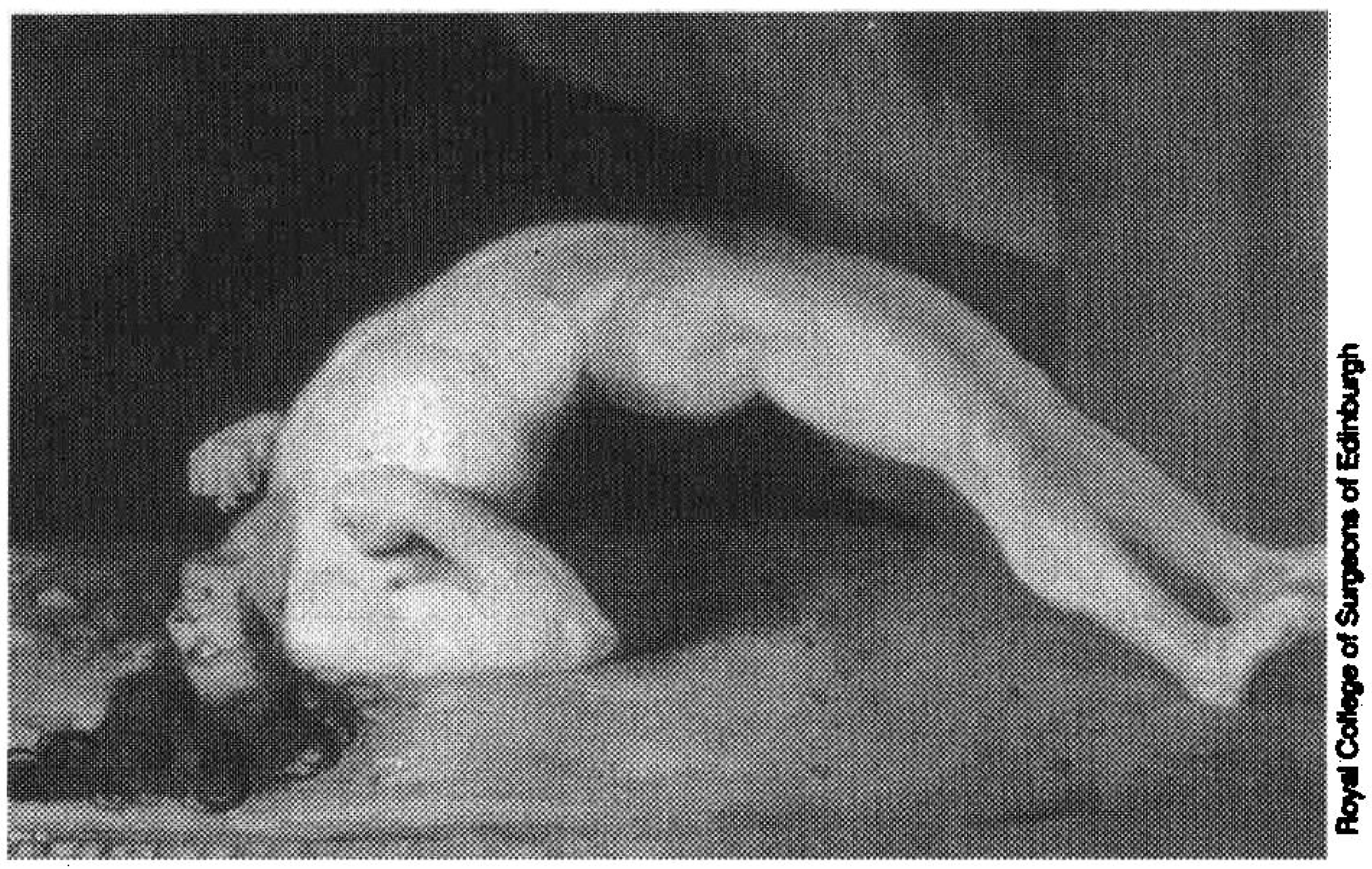


图 27.19　死于破伤风的一个士兵。可见僵硬性瘫痪。这幅 Charles Bell 创作的油画保存在苏格兰皇家外科医学院，爱丁堡。

现毒素。这种微生物也可从伤口中培养，但是成功率变化很大。

破伤风梭菌的天然宿主是土壤。因为破伤风梭菌是人体的一种偶然性病原，而且不依赖于人类或其他动物而繁殖，所以不可能根除这种病原。因此，控制措施必须着重于预防上。

破伤风是一种可预防的疾病。现有的疫苗（见 22.13 节）对于预防这种疾病完全有效。实际上所有患破伤风的人都是因为没有接受适当免疫。很令人惊讶的是，感染疾病最快的人群是 25～29 岁的青年，推测可能是因为公众健康免疫系统只针对婴儿、学龄少年和 60 岁以上的老年人。

对严重伤口、撕裂和穿刺伤的适当治疗措施为立即接种破伤风类毒素疫苗。如果伤口很严重且被土壤所污染，就应该进行抗毒素制剂的治疗，尤其在不知道患者是否免疫或其免疫早已过期的情况下。抗毒素是一种针对破伤风的抗体制剂，一旦破伤风毒素释放就会中和它（见 22.13 节）。以上这些方法都可以防止破伤风的发生。

对严重症状的破伤风治疗方法包括：①抗生素治疗，通常使用的抗生素是青霉素，可以阻止破伤风梭菌生长和产生毒素；②抗毒素治疗，可以阻止新释放毒素和细胞的结合；③辅助性治疗如镇静剂、肌肉缓解剂，以及机械呼吸来对抗瘫痪。这种水平上的治疗不能反转病症，因为已经结合到组织上的毒素是不能被中和的。即使使用抗毒素、抗生素和辅助性疗法，破伤风患者发病率和死亡率仍然很高。

一些梭菌种是病原，但也是土壤中微生物群体中的正常成员，因此不可能被根除。所有产生强效毒素的种都能引发疾病。破伤风梭菌仅在土壤中被发现，但是也会偶然在人类和其他动物肠道微生物群中发现肉毒梭菌和杀咽梭菌（见 21.4 节）。我们在第 29 章中可以看到，产气荚膜梭菌和肉毒梭菌是食物传播疾病中重要的潜在病原，梭菌来源是被梭菌内生孢子土壤污染的食物。内生孢子在不当的消毒和食物保存条件下会出芽，继而产生外毒素引发疾病。

概念检查

破伤风梭菌是引发破伤风的唯一土壤微生物，破伤风的特征是产生毒素和僵硬性瘫

痪。破伤风可以通过恰当的免疫来预防。对于严重破伤风的治疗大体来说疗效不佳，发病率和致死率还是很高。

◆ 描述破伤风梭菌感染和破伤风毒素的产生过程。

◆ 描述破伤风毒素作用于宿主的总体效果，列出预防穿刺伤患者破伤风发病的方法。

复习题

1. 美国最容易携带狂犬病的动物是什么？目前正在实行哪种免疫措施来治疗狂犬病和预防狂犬病？（见 27.1 节）
2. 为什么汉坦病毒肺部综合征（HPS）在美国成为了一种人类病原？怎样预防 HPS？（见 27.2 节）
3. 引起立克次氏体疾病的生物有哪三种？斑疹伤寒、斑疹热和埃里希氏体病最常见的宿主和载体分别是什么？（见 27.3 节）
4. 莱姆病在美国的最常见宿主和载体是什么？怎样控制莱姆病的传播？怎样治疗？（见 27.4 节）
5. 疟疾的症状之一是打颤后的长期发烧，这种症状与间日疟原虫和恶性疟原虫这两种病原有关。试描述病原在人类宿主中的生长阶段，并把它和发烧打颤联系起来。为什么西欧人的后代比非洲或地中海人的后代更容易得疟疾？（见 27.5 节）
6. 试阐述西尼罗病毒的生命过程以及蚊子在其生命过程中发挥的作用。西尼罗病毒的主要宿主是什么动物？人类是其中间宿主么？回答并解释。（见 27.6 节）
7. 对于一种潜在的严重疾病如鼠疫，为什么没有供大众使用的疫苗？可以采取什么公众健康措施来控制这种疾病？（见 27.7 节）
8. 大多数真菌病原的宿主是什么？怎样控制接触真菌？真菌给临床治疗带来的最大难题是什么？（见 27.8 节）
9. 请描述破伤风梭菌的侵袭性和毒性。讨论破伤风的主要致病机制，确定预防和治疗的措施。（见 27.9 节）

应用题

1. 如果一个小孩被走失的狗咬伤，而他未接受过狂犬病疫苗接种，现有两种不同情况，一个是你抓住这只狗并把它关起来，另一个是狗逃走。试描述在这两种情况下你将分别采取的一系列措施。如果这个小孩已经接受过疫苗接种，你采取的措施会有什么不同？
2. 讨论至少三种常见的病原的特征，复习斑疹热、斑疹伤寒和埃里希氏体病的发病过程。为什么埃里希氏体病是一种重要的立克次氏体病？将其与莱姆病比较。
3. 根除疟疾作为公众健康计划的目标已经至少一百年了。什么原因使得我们无法根除疟疾？如果研发出一种有效的疫苗，疟疾能被根除么？试将这种可能性与消除鼠疫

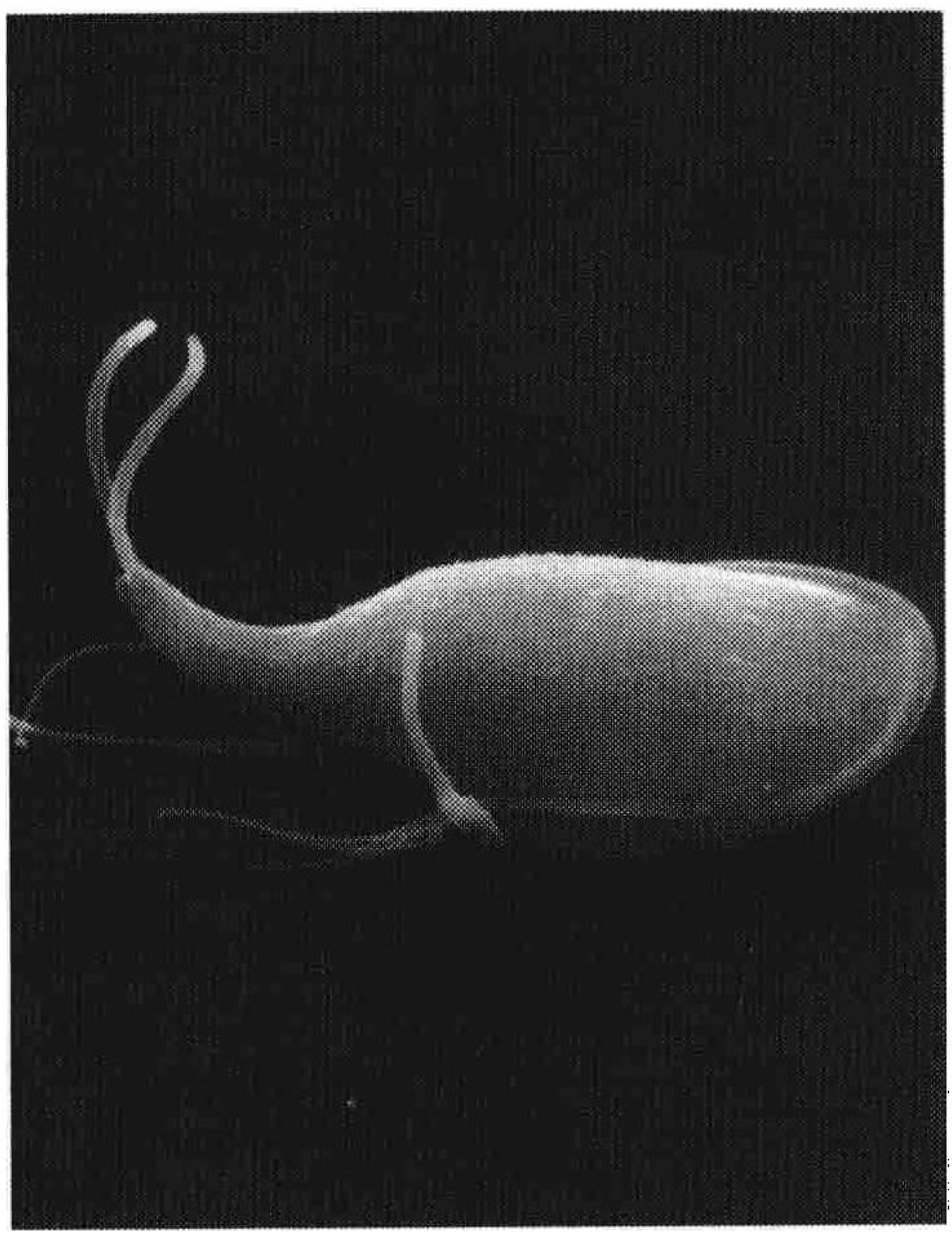
的可能性相比较。

4. 试设计一种方法来阻止西尼罗病毒传播到你们社区内的人群中。这样一个计划在个人水平和社区水平上所需的费用分别是多少？调查你所在社区是否正进行灭蚊计划？可以采取哪些方法来减少蚊子数量？

（乔文涛　译，牛淑敏　校）

28

废水处理、水的纯化和由水体传播的微生物疾病



水体是传染性疾病最常见的感染途径。建立水处理标准以防止细菌、病毒和原生动物的感染，如上图照片中显示的为原生动物贾第鞭毛虫(*Giardia*)的细胞。

词汇表

需氧二级废水处理（aerobic secondary wastewater treatment）：通过微生物在有氧条件下的消化作用来处理有机物低含量废水的过程

厌氧二级废水处理（anoxic secondary wastewater treatment）：通过微生物在厌氧条件下的消化和发酵反应处理含有不能溶解的有机物质高含量废水的过程

生化需氧量（biochemical oxygen demand，BOD）：微生物全部氧化水样中有机和无机物质所消耗溶解氧的量

氯胺（chloramine）：氯和氨以精确比例结合的一种化学合成的物质

氯（chlorine）：一种用于对水进行消毒的气态化学物质，用后水体中有残留物

澄清池（凝聚池）［clarifier（coagulation basin）］：能将天然水中悬浮的固体凝聚并去除的一种蓄水池

凝聚（coagulation）：通过添加硫酸铝和阴离子聚合物使较小的、胶状的颗粒形成大的、不溶的颗粒

大肠菌群（coliform）：一种兼性好氧、革兰氏阴性、不形成孢子、能发酵乳糖的细菌

孢囊（cyst）：一种原生动物寄生虫的感染形式，外面包被一层能进行化学和物理抵抗作用的厚外壳

分配系统（distribution system）：水管、蓄水池、蓄水坛和一些其他的在将饮用水传输到用户及在传输前的储备中所使用的设施

流出水（effluent water）：从废水处理设备中流出的处理过的水

过滤（filtration）：通过将水流过一个或多个渗透膜或其他介质（如沙、无烟煤、硅藻土）而将其中的悬浮颗粒去除的过程

处理水（finished water）：经过处理之后传输到分配系统的水

絮凝（flocculation）：凝聚之后的废水处理过程，通过温和搅拌的方式使悬浮的颗粒形成较大的团块

脑膜脑炎（meningoencephalitis）：福纳氏虫（*Naeglera fowleri*）或其他各种各样的病原体引起的对脑组织的侵袭、炎症和损伤

聚合物（polymer）：在水的纯化过程中絮凝一步中作为凝聚剂的一种液态化学物质

饮用水（potable）：对人类是可以饮用的、安全的水

一级废水处理（primary wastewater treatment）：物理法去除水中的污染物，通常通过分离和沉淀的方法

生水（raw water）：没有经过任何方法处理过的表层水或地下水，也称未处理水

沉积物（sediment）：存在于生水中的土、沙、矿物质和其他较大的颗粒

污水（sewage）：含有人类或动物排泄物的液体流出物

悬浮物（suspended solid）：用常规的物理手段难以分离的小的固体颗粒污染物

三级废水处理（tertiary wastewater treatment）：物理化学过程处理废水以降低无机营养物水平

浊度（turbidity）：对水中的悬浮固体物质的一个量度

未处理水（untreated water）：没有经过任何方法处理过的表层水或地下水，也称生水

废水（wastewater）：未经处理不能排放到湖泊与溪流中的生活或工业用水

废水（wastewater）是来自家庭的污水或工业使用后未经处理的用水，出于公共健康、经济、环境和景观的考虑，它们不能以未处理的形式排放到湖泊和溪流中。清洁、

纯净的水对公共健康来说是绝对必要的，所以，一些检测、评价水质量的步骤也是必需的。然而，水的质量有时候是会打折扣的，甚至在公共处理的废水和饮用水系统中。水质量的下降会加速威胁生命的传染性疾病的蔓延。本章讲述水处理和水纯化的标准办法以及各种水传播的疾病。

Ⅰ 废水微生物学和水的纯化

水是传染性疾病的重要的潜在传播途径，而水的纯化是确保公共健康的重要因素之一。通常使用的水质监测方法依赖于标准化的微生物学技术。除了物理的和化学的纯化步骤之外，水处理和纯化方案中将使用到各种依赖于微生物学的标准方法，以便对水体进行监测、去除或降低污染。

28.1 公共健康和水的质量

我们怎样才能确保饮用水是安全的呢？即使是看上去干净清澈的水也有可能已被致病微生物污染，可能对健康具有潜在的危险。不幸的是，检测水中存在的各种致病微生物又是不切实际的，而且在水的供应中少量的非致病有机体一般是可以容忍的甚至也是不可避免的。但是，取水样观察是否含有包含致病菌的某些特定微生物菌群是可行的。在这里我们讨论识别水体中潜在的有害微生物的常用方法。

大肠菌群

特定指示微生物的存在表明水源中可能污染了致病菌。在微生物的水污染中应用最广泛的指示菌为大肠菌群（coliform）。大肠菌群能作为水污染的指示菌是因为它们中的大多数都大量存在于人类和其他动物的消化道内。这样，水中大肠菌群的存在就表明被粪便污染。大肠菌群被定义为兼性好氧、革兰氏阴性、不形成孢子的杆状细菌。在35℃，48h内发酵产乳糖产气。然而，这是个操作界定而不具分类学意义，而且大肠菌群包括各种微生物。大部分大肠菌群是肠道细菌的成员（见12.11节）。例如，大肠菌群包括大肠杆菌，一种常见的肠道微生物；肺炎克雷氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae*），一种不太常见的肠道内寄生物。然而，产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*），一种不存在于肠道内的微生物，因为它的发酵特性也被归为大肠菌群。

一般说来，我们认为当水样中存在大肠菌群时就表明水已被粪便污染，变得不安全，不能直接作为人类的饮用水了。当大肠菌群排入水中后，最终会死亡，但死亡速度不像病原微生物那样快。大肠菌群和病原体在水的纯化过程中表现出的特征相似。

大肠菌群的检测

有两种检测水样中大肠菌群的方法，它们是稀释频度法（most-probable-number，MPN）和薄膜滤器法（membrane filter，MF）。MPN法是使用试管中的液体培养基，将饮用水样品按一定浓度稀释加入到培养基中，在培养基中的生长将表明水中的微生物污染程度。较常用的MF法，至少要将100ml的水样通过无菌过滤膜以除去细菌（见

20.3 节)。将滤膜放在可高度选择大肠菌群的伊红美蓝 (EMB) 培养基表面 (图 28.1, 见 24.2 节) 进行培养,大肠菌群菌落计数,从这个值可以推测原水样中大肠菌群的数量。在那些处理良好的水系中,大肠菌群试验应为阴性;如果大肠菌群试验是阳性,就证明纯化或分配系统中出现了问题。

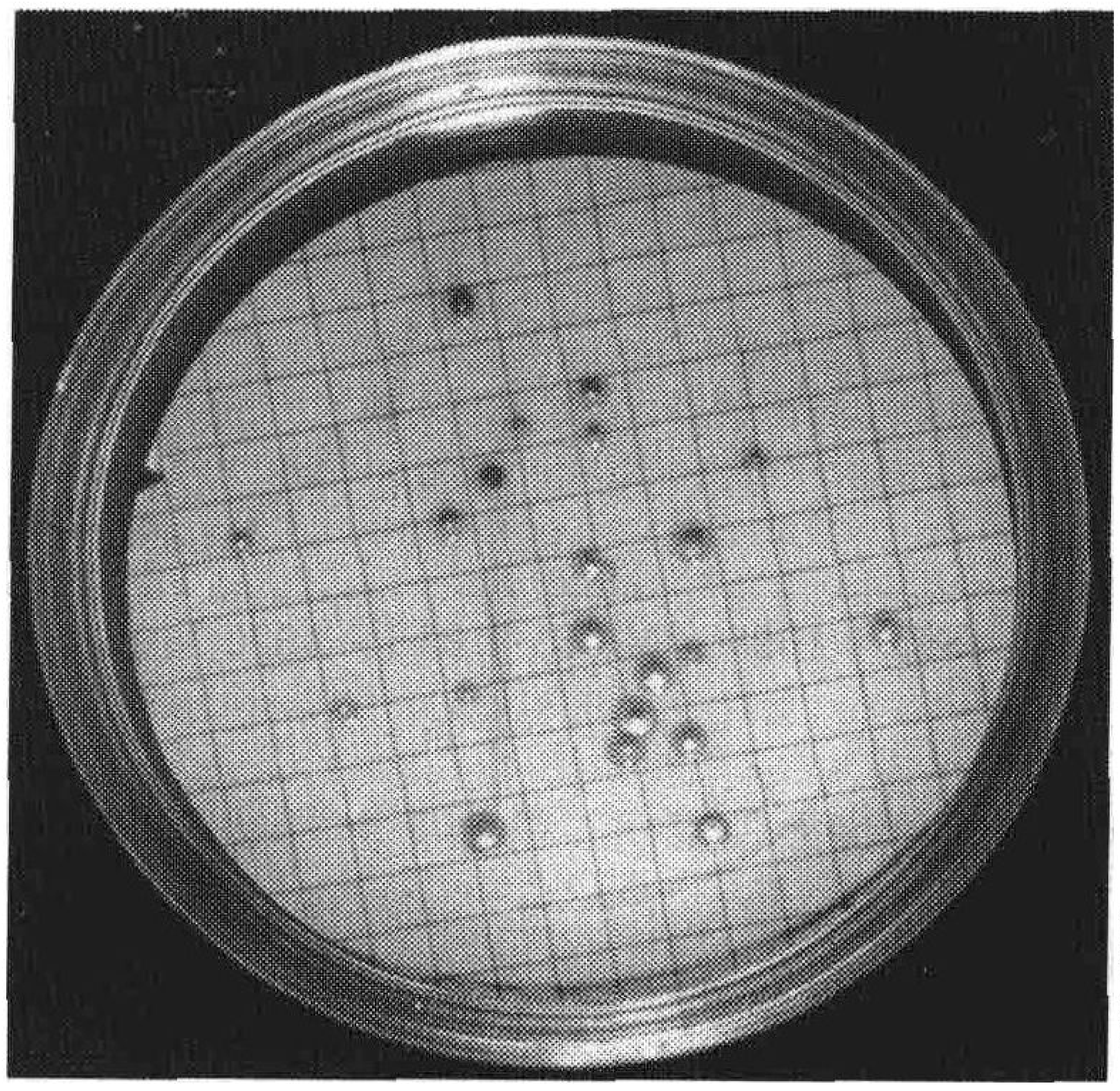


图 28.1　生长在过滤膜上的大肠菌群菌落。饮用水的水样通过过滤膜。滤膜放在伊红美蓝培养基上,既能筛选又能鉴别发酵乳糖的细菌 (大肠菌群) (见 24.2 节)。黑色的克隆为大肠菌群的特点。每个菌落是由原水样中的一个大肠杆菌活细胞生长而形成的。

美国的安全饮用水法规定了饮用水标准,其中构建了进行饮用水标准制定的框架。当使用薄膜滤器 (MF) 技术时,需过滤 100ml 的水样。出于安全考虑,大肠菌群在样品水中的数目符合如下标准:①每个月所有检测样品算术平均值不超过 1/100ml 水;②每个月检查少于 20 个水样时,4/100ml 的水样不超过一个;③当每个月检查 20 个或 20 个以上水样时,4/100ml 的水样不超过 5%。水管理部门要向 EPA 报告检查结果,如果达不到预期的标准,他们必须提醒有关部门注意并采取措施解决问题。很多小单位甚至大城市也达不到标准。

公共健康和饮用水纯化

目前发达国家水传播的疾病发病率较低,以至于很难采用饮用水的标准评价水处理的效果。在发达国家大部分的消化道感染已不再是由水传播而是通过食物传播 (第 29 章)。然而,直到 20 世纪才确立了高度有效的水处理措施。

直到 1905 年,发展并使用了大肠菌群计数法才建立了用于估测污染饮用水对健康影响的微生物培养法。之前,水的纯化仅限于过滤以降低浊度。尽管过滤显著地降低了水中微生物的数量,然而有些微生物个体还是能通过滤膜。大约在 1910 年,发现氯 (chlorine) 是批量供应水非常有效的消毒剂。氯气如此有效并且价格便宜,以至于使其作为饮用水的通用消毒剂得到了广泛应用,并且在降低水传播疾病方面起到了重要作用。图 28.2 显示在美国几个主要城市施行了过滤和氯化处理两种纯化方法后,斑疹热 [由伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 传染] 的发病率显著下降。在其他城市也获得

了类似结果。

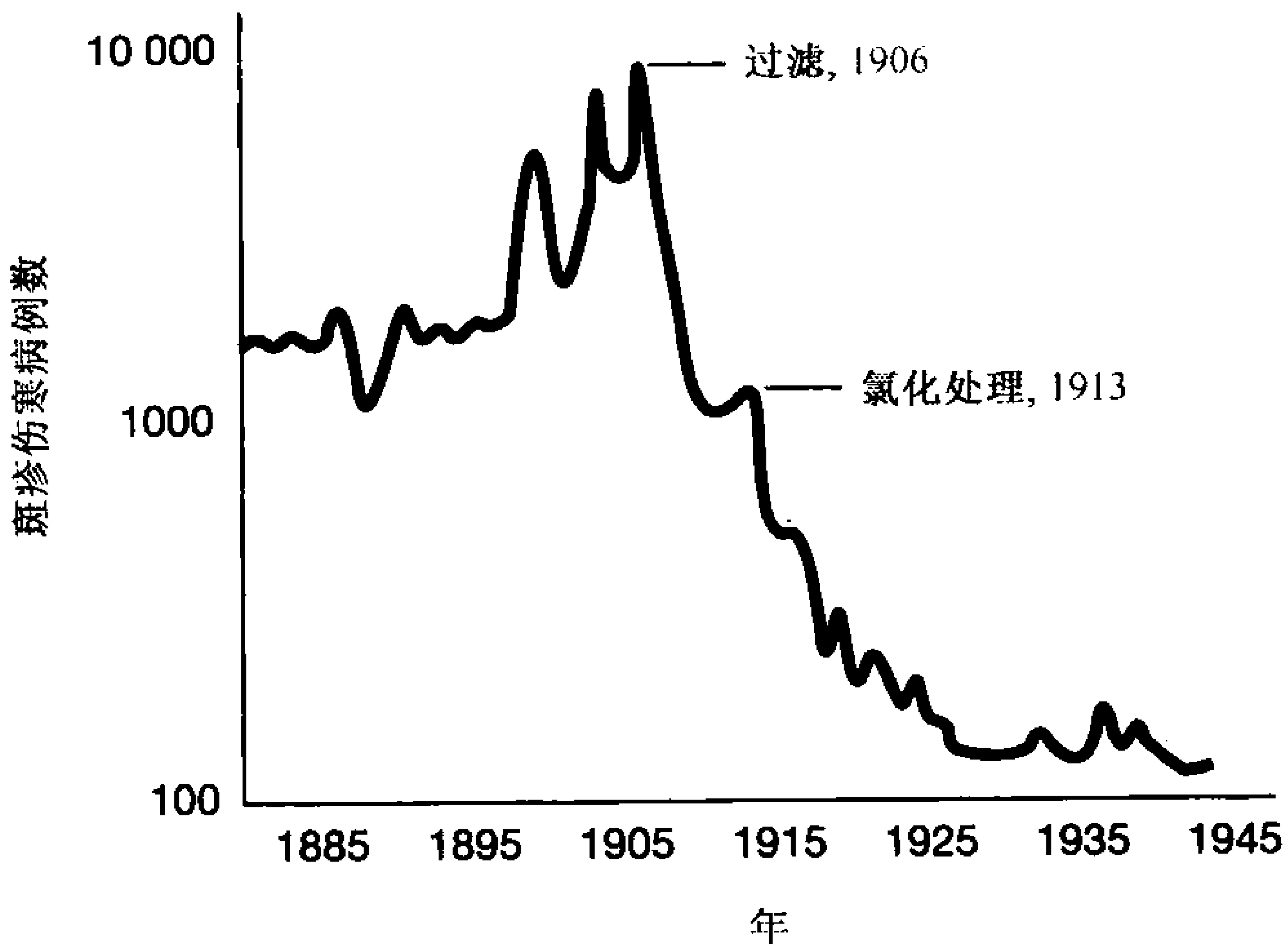


图 28.2　水的纯化作用影响水传播性疾病的发生率。本图表显示使用过滤和氯化消毒法处理饮用水前后在费城（美国宾夕法尼亚州）斑疹伤寒发病率的趋势。在使用过滤和氯化消毒法后斑疹伤寒的发病率显著下降。其他的水传播性疾病也有类似结果。

在美国，公共健康水平显著提高始于 20 世纪初期，主要归功于应用于大量的、公共性的废水和饮用水处理设施中水处理步骤的建立。如果没有确立饮用水中大肠菌含量的标准方法，那么过滤和氯化处理的效果也不会得以确认。所以，工程学、微生物学和公共健康永远是齐头并进的。

概念检查

通过计数大肠菌来确定饮用水的质量。严格的微生物学标准使这一方法在美国所有的公共水供应中成为可靠的并且是可重复的指标。供应水的过滤法和氯化处理法显著地降低了微生物的含量。饮用水纯化方法的应用是目前发明的最重要公共卫生措施之一。

◆ 为什么来自饮用水的细菌菌落在 EMB 培养基上的生长指示了供应水的粪便污染？

◆ 一般采用什么样的方法来减少供应水中的微生物含量？

28.2　废水和污水处理

废水和污水处理包括大规模地使用微生物于工业化水平的生物转化。废水进入一个处理设施，处理完成后的流出水（effluent water）（从废水处理设备中流出的处理后水）可以排入表层水像湖泊、溪流，或者进入饮用水纯化设备。

废水和污水

家庭污水或工业来源的水不能以未处理的形式排放到湖泊或溪流中。污水（sew-

age）是被人或动物粪便等物质污染了的液体流出物。废水通常是指含有潜在有害的有机物和无机物或含有病原微生物的水。完整的废水处理包括物理的、化学的和生物的（微生物学的）处理以除去或中和污染。

在美国个人用于洗刷、烹饪、饮用和厕所使用的水每天可达 100～200gal［1gal（UK）＝4.54609L］。所以废水在排放到表层水中之前必须先经过处理以除去污染物。在美国大约有 16 000 所共有废水处理工厂（publicly owned treatment work，POTW）。大部分的公共废水处理厂都相当小，每天处理 100 万 gal（3 800 000L）或更少的废水。然而，这些设备每天总共可以处理 32 000 000 000gal 的水。废水处理设施往往既能处理家庭废水（domestic wastewater）也能处理工业废水。家庭废水主要由污水、“白色水”（洗、刷、烹饪产生的水）和食品制作产生的废水组成。

工业废水（industrial wastewater）主要包括石化、杀虫剂、食品和乳制品、塑料、制药和冶金工业所排放的液体。工业废水中可能含有有毒物质，并且一些工厂的工业废水在进入共有废水处理厂前要先按照美国环境保护机构（environmental protection agency，EPA）的要求对具有毒性和严重污染的排出物进行预处理。预处理可能包括简单的机械过程，也就是去除可能会阻塞废水处理管道的残渣。然而，一些废水要进行物理的或化学的预处理以除去高度毒性物质像氰化物，重金属像砷、铅和汞，或者是一些有机物像丙烯酰胺、莠去津（一种除草剂）和苯。这些物质经过化学物质或微生物的降解与氧化、沉淀或挥发的处理转化为低毒的物质。预处理过的废水这时可以排放到公共废水处理厂中。

废水处理和生化需氧量

废水处理的目的就是，减少废水中的有机物和无机物达到一定的水平，直至不能再维持微生物的生长、并且去除其他的潜在毒性物质。处理的效果通过生化需氧量（biochemical oxygen demand，BOD）的减少来表达，生化需氧量是指微生物全部氧化水样中的有机和无机物质所消耗的溶解氧的量（见 19.5 节）。废水中含较高水平的可氧化的有机和无机物质就产生较高水平的 BOD。

家庭废水，包括污水的典型的 BOD 数值为 200 个单位。对于工业废水，例如来源于乳制品工厂的水，其 BOD 数值可高达 1500 个单位。一个有效的废水处理设施其排出的废水 BOD 水平降至低于 5 个单位。废水处理设施必须设计为既能处理低 BOD 水平的污水也能处理高 BOD 水平的工业废水。

处理是一个物理和生物多步骤的操作过程（图 28.3）。采用一级、二级，有时三级处理来减少处理后水中的粪便和化学污染。每个阶段的处理都会用到更复杂或更昂贵的技术。

一级废水处理

一级废水处理（primary wastewater treatment）仅使用物理分离的方法从废水中分离出固体和微粒状的有机和无机物质。废水在进入处理设备之前先要经过一系列的筛滤栅和筛子以除去大的固形物。流出物沉淀数小时使固形物沉到分离池的底部（图 28.4）。

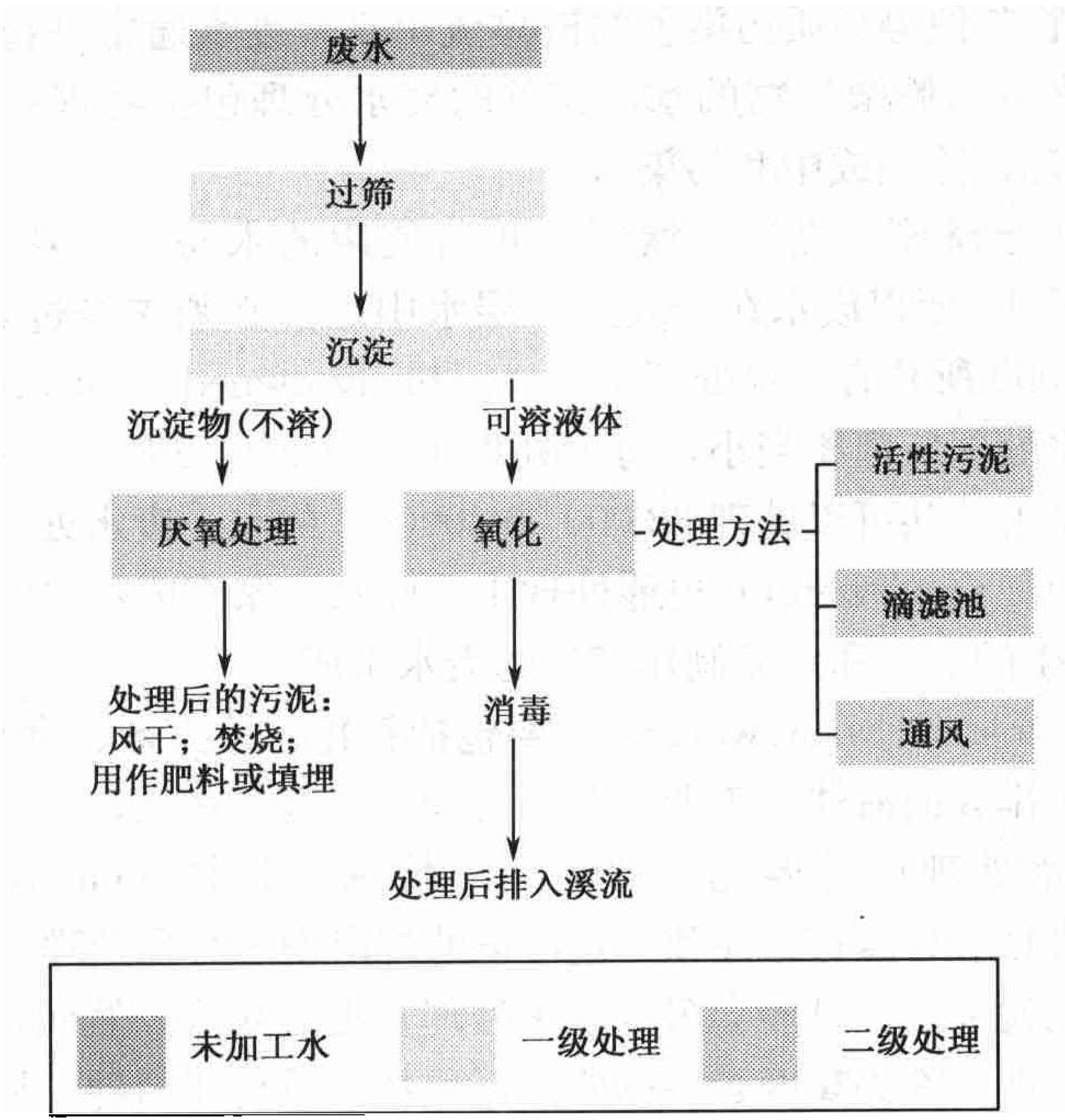


图 28.3　废水处理过程。用于一级和二级废水处理法的有效的废水处理过程如图所示。废水中可以含有从 200 BOD 单位（污水和家庭废水）到 1500 或更多的 BOD 单位（工业废水）。从处理设施流出的液体通常含有 5 个或更少的 BOD 单位。流出水很少再进行降低 BOD 的三级处理，因为从成效上来说不是很值得。

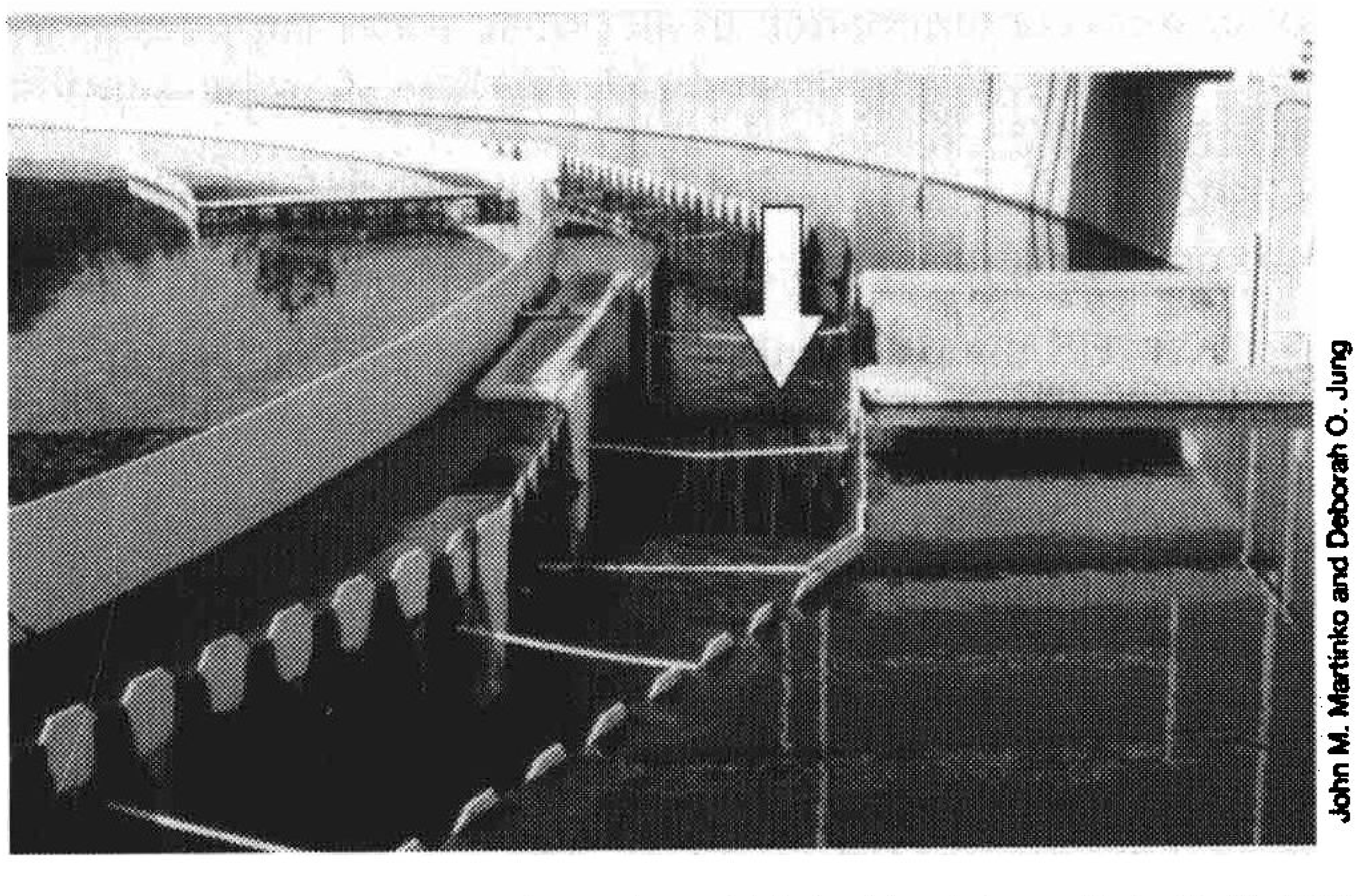


图 28.4　废水的一级处理。废水排入蓄水池中固形物沉淀下来。当水位升高的时候水就会通过筛滤栅溢出，连续地降低水位。处于最低水位的水中已经没有固体了，于是通过溢洪道排入到二级处理设施中。

如果仅进行初级处理，当排出物排放到邻近的排水沟时，城市仍会遭受到极度的水污染，因为初级处理后水中仍会含有很高水平的可溶的和悬浮的有机物质和其他的污染物。这些污染物（营养物）可导致不必要的微生物的生长繁殖（图 19.10），进一步降低水的质量。所以，大部分的处理工厂都采用二级甚至三级处理，以便在排放到自然排水沟之前来减少废水有机物的含量。二级处理过程在有氧和无氧条件下用微生物的消化

作用来进一步减少废水中的有机营养物。

厌氧二级废水处理

厌氧二级废水处理（anoxic secondary wastewater treatment）包括一系列的由许多细菌和古生菌种群在无氧条件下进行的消化和发酵反应。厌氧处理通常用于处理含大量不溶有机物（BOD 值很高）的废水，像来自于食品和乳制品生产厂的含有纤维和纤维素的废水。厌氧消化过程在称为消化池或生物反应器（图 28.5a 和图 28.5b）的封闭容器内进行。这个过程需要很多种微生物的共同作用。主要的反应概括在图 28.5c 中。

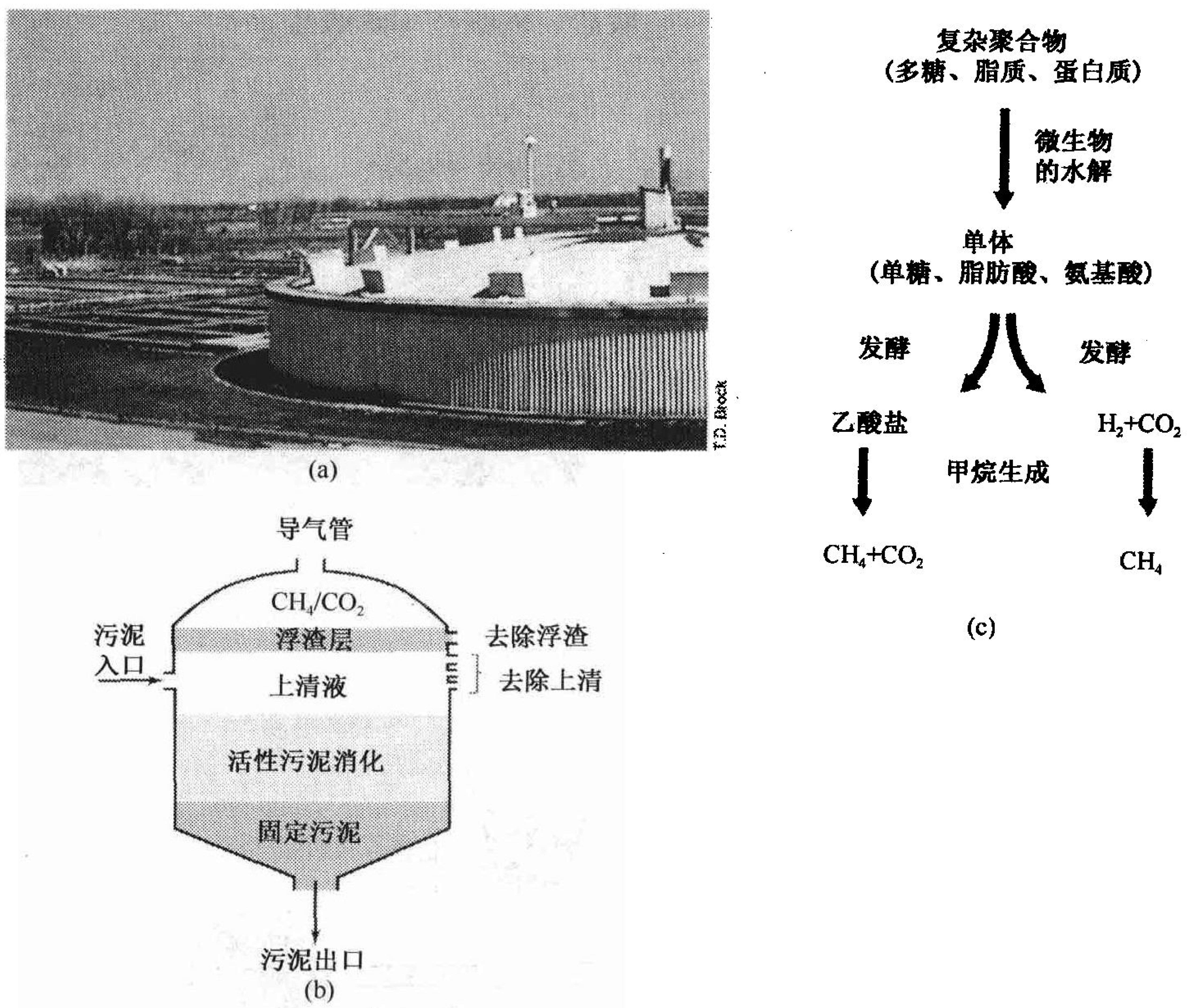


图 28.5　厌氧二级废水处理。（a）厌氧消化池。只显示了池的顶部，其他部分在地下。（b）消化池的内部工作。（c）在厌氧污泥消化中发生的主要微生物反应过程。甲烷和二氧化碳是厌氧的生物反应的主要产物（见 17.17 节）。图 19.23 显示了在厌氧分解过程中主要的微生物菌群以及他们在甲烷生成过程中的相互作用。

通过固有厌氧微生物的反应，废水中的大分子化合物成分首先被多糖酶、蛋白酶、脂肪酶降解为可溶性的物质。然后这些可溶性物质发酵产生脂肪酸、H_2 和 CO_2 的混合物；脂肪酸被进一步发酵成为乙酸、CO_2 和 H_2。这些产物再作为产甲烷古生菌的底物，发生下面的反应：$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$ 和 $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$（图 28.5c）。这样，厌氧污水处理的主要产物为 CH_4（甲烷）和 CO_2。甲烷可以被收集起来或者燃烧掉或者作为处理厂加热的燃料和能源。

需氧二级废水处理

需氧二级废水处理（aerobic secondary wastewater treatment）利用微生物在有氧条件下的消化反应，来处理含有有机物质水平较低的废水。一般说来非工业废水仅使用好氧的二级废水处理就可以得到有效的处理。有几种有氧分解过程可用于废水处理，但最常用的是生物滤池（trickling filter）和活性污泥法（activated sludge method）。生物滤池（图 28.6a）是碎石块床，约 2m 厚，废水喷洒在其顶部。液体缓慢通过石块床，有机物吸附在石块上，在暴露的石块表面会有微生物的生长。有机物质在石块的微生物膜上发生完全矿化生成二氧化碳、氨、硝酸盐、硫酸盐和磷酸盐。

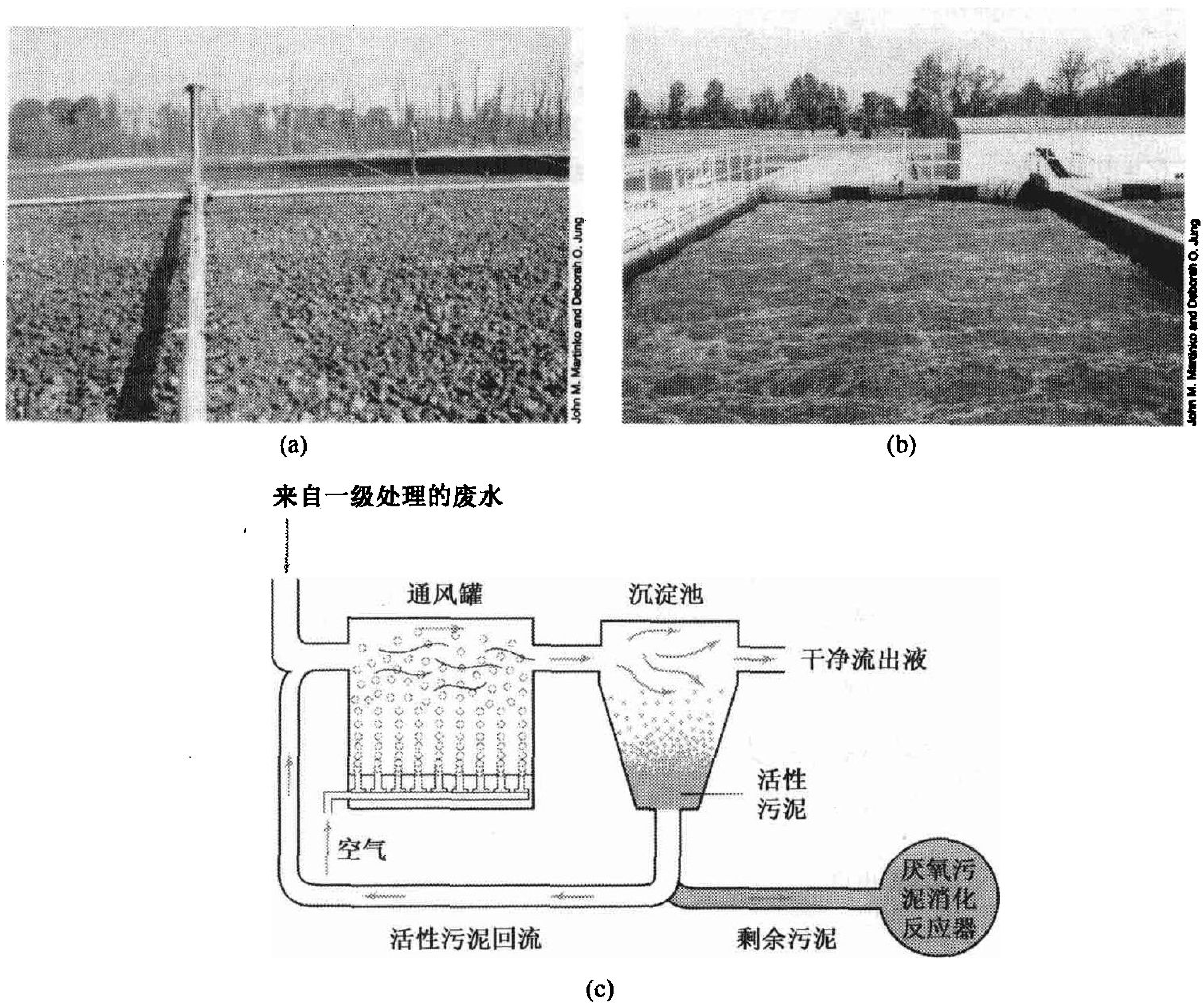


图 28.6 好氧的废水处理过程。 小城市伊利诺伊州的废水处理厂。（a）生物滤池吊杆旋转，缓慢地分配废水，最终落在碎石床上。碎石直径 10～15cm，床深 2m。（b、c）活性污泥处理过程。（b）安装在大城市废水处理厂的活性污泥曝气池。该池 30m 长，10m 宽，5m 深。（c）废水流经一个活性污泥装置。活性污泥循环到曝气池中使得微生物可以有氧消耗废水中的有机成分。厌氧的污泥反应器在图 28.5 中有详细描述，并且微生物间的主要相互作用在图 19.23 中有描述。

最常用的需氧废水处理是活性污泥法。在这里，废水在一个大的处理池（图 28.6b）中混合并曝气。黏细菌包括生枝动胶菌（*Zoogloea ramigera*），和其他的细菌生长并形成菌胶团或更大的团块（图 28.7）。这些菌胶团成为原生动物，其他动物，丝状细菌和真菌的吸附介质。氧化的基本过程同生物滤池法相似。用泵将含菌胶团的废水

排入到存储池或澄清池中，在这里菌胶团沉淀下来。一些菌胶团（称为活性污泥）作为菌种重新回到曝气池中，其他的被排入到厌氧污泥反应器中或者是被直接除去，烘干，燃烧或者作为肥料。

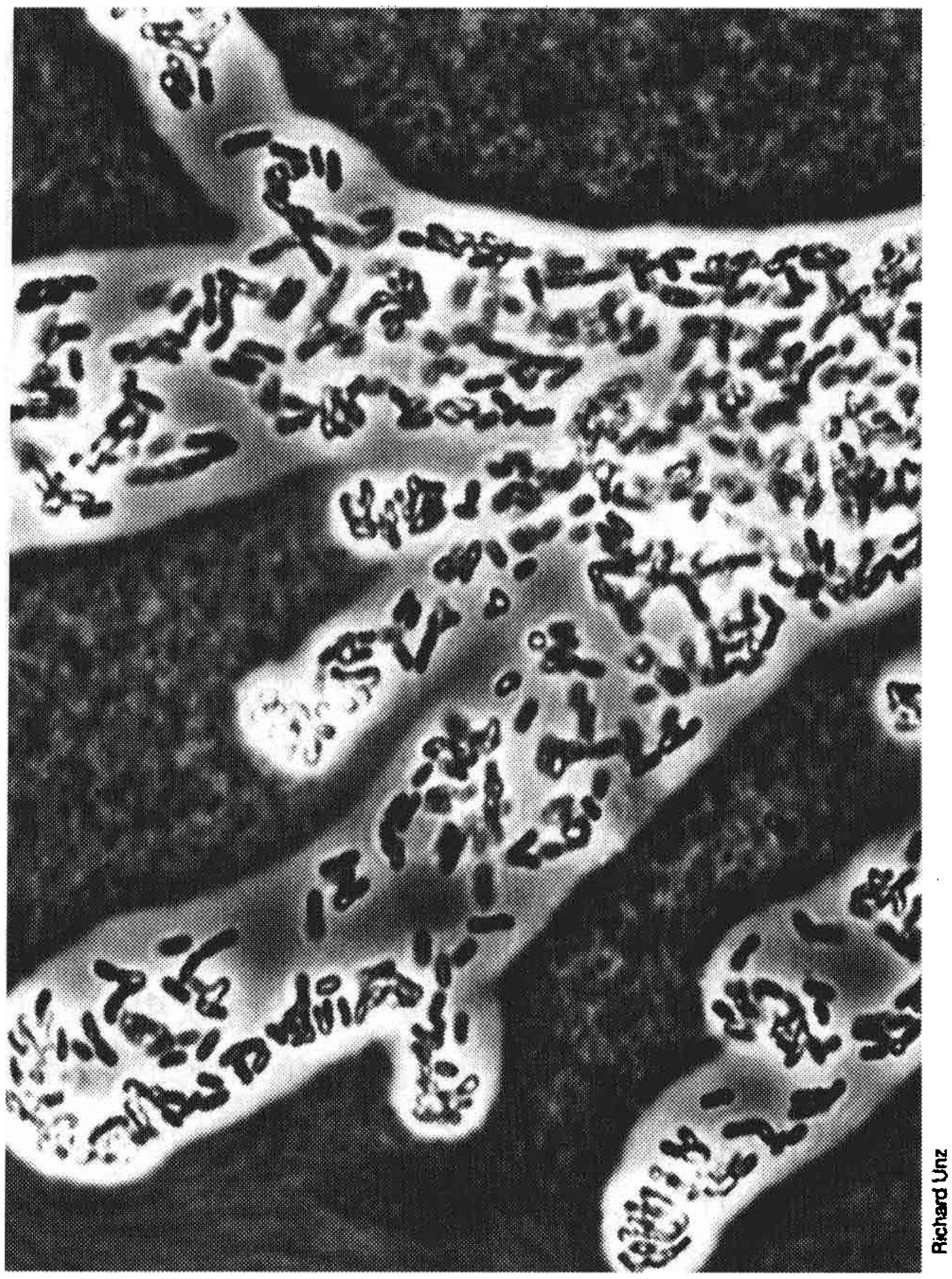


图 28.7　细菌生枝动胶菌（*Zoogloea ramigera*）形成的菌胶团。该菌胶团在活性污泥处理过程中被发现，由许多小的、杆状的生枝动胶菌细胞组成，外面包被一层多聚糖黏液层，排列成有特点的“手指状”。印度墨汁染色阴性。动胶菌 *Zoogloea* 的生物学性质在 12.7 节中介绍。

废水通常在活性污泥池中保留 5～10h，尽管这个时间较短不能使所有的有机物质彻底氧化，但是在这个过程中很多的可溶有机物质吸附到菌胶团上并且与微生物细胞混合。流出液的 BOD 值在这一过程中有了相当大的减少（高达 95%），因为大部分的 BOD 存在于沉淀下来的菌胶团中。如果菌胶团再被重新传输到厌氧污泥反应器中被转化为 CO_2 和 CH_4，BOD 几乎可以完全的降低。

三级废水处理

三级废水处理（tertiary wastewater treatment）是物理化学或生物过程，采用类似于饮用水纯化（见 28.3 节）的生物反应器，沉淀、过滤或氯化处理等步骤。目的是迅速地降低最终流出液中的无机营养物质，尤其是磷酸盐、亚硝酸盐和硝酸盐。

目前大部分的处理厂在二级处理过程的最后都对流出液进行氯化处理（进一步减少可能存在的微生物污染），然后将处理过的废水排入到溪流或湖泊中。在美国东部很多废水处理厂现在均采用紫外线辐射消毒流出水。臭氧是一种强氧化剂，是有效的杀菌剂和杀病毒剂，目前在美国有超过 40 个厂家将其作为废水消毒剂。

废水经过合适的三级处理后几乎不再含有支持微生物生长的营养物质。三级处理是废水处理最完整的方法。但由于其成本太高而没有得到广泛应用。

概念检查

废水处理就是处理污水和工业废水使其 BOD（生化需氧量）降低到可接受水平。一级、二级和三级废水处理包括物理、生物和物理化学过程。经过二级和选择性三级处理后可以直接排放到水纯化厂。

◆ 什么是生化需氧量（BOD）？为什么在废水处理过程中 BOD 的减少是必需的？
◆ 简述在污水处理过程中的一级、二级（厌氧和好氧）和三级处理过程。
◆ 指出废水处理的终产物。这些终产物可以怎样使用？

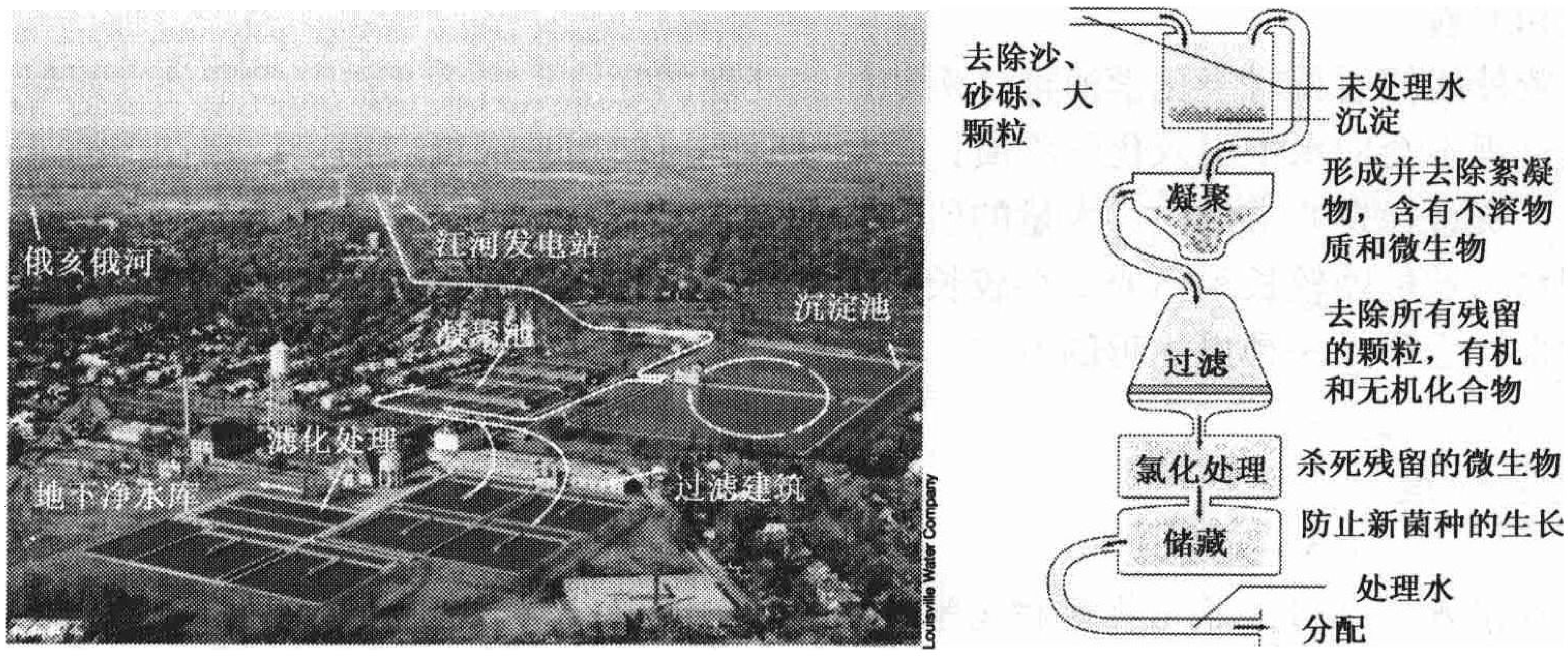
28.3 饮用水的纯化

经过二级方法处理过的废水一般说来可以被直接排放到河道或溪流中。但是，这样的水不适于饮用（potable）或对人类使用是不安全的。可饮用水的生产需要进一步处理，去除潜在的病原微生物，除去异味，减少无益的化学物质（如铁和锰），降低浊度（turbidity）（悬浮固体物质的量度）。悬浮固体（suspended solid）是一些用普通的物理方法不能除去的固体污染的碎片。

物理和化学纯化

图 28.8a 展示了一个中型城市典型的饮用水纯化设施。图 28.8b 描绘了未处理水（untreated water）通过一个典型的处理装置的流程。未处理水首先从来源（在这里是河流）泵送到沉淀池，在该步中加入阴离子聚合物（polymer）、明矾（硫酸铝钾）和氯。沉积物（sediment）、土壤、沙、矿物质碎片和其他大的碎片被除去。沉淀后的水被排入到澄清池（clarifier）或凝聚池（coagulation basin）中，这是一个大的储水池，在这里发生凝聚（coagulation）。明矾和阴离子聚合物使很多较小的固体悬浮物形成大的颗粒。混合后，这些颗粒继续相互作用形成大的团块，这一步称为絮凝（flocculation）。这些大的絮集的微粒称为絮凝物，通过重力沉淀下来，它们诱捕微生物并且吸附悬浮的有机物质和沉积物。

经过凝聚和絮凝后，澄清后的水进行过滤（filtration）。通过一系列设计好的滤膜，除去任何残留的有机或无机不溶物以及任何悬浮的微粒和微生物。滤膜通常包含厚层的沙、活性炭和离子交换过滤介质。结合前面的几步纯化步骤，过滤后的水去除了所有普通物质，大部分的有机、无机物质和几乎所有的微生物。



(a)　(b)

图 28.8　水纯化厂。(a) 俯瞰美国肯塔基州路易斯威尔的一个水处理厂。箭头表示水流过工厂的方向。(b) 一个典型的公共水纯化系统总览示意图。

消毒

经过澄清、过滤后的水作为纯净、可饮用的处理水（finished water）被输送到供应系统之前必须经过消毒。加氯消毒法（chlorination）是最通用的消毒方法。在足够剂量情况下，氯能在 30min 内杀死微生物［某些病原性原生动物像隐孢子虫属（*Cryptosporidium*）氯化处理法不易被杀死，所以是重要的水传播性病原菌；见 28.6 节］。除了杀死微生物外，氯与有机物反应可以氧化并且有效地中和这些物质。因为大部分产生古怪气味的化合物在自然界中是有机物，所以氯化处理也能改善水的味道和气味。以浓缩的次氯酸钠溶液或者是高氯钙盐形式的氯加入到水中，也可以以氯气的形式从压力罐中加入到水中。后一种方法在大型水处理厂中广泛使用，因为这个过程最适合于自动化控制。

氯在与有机物的反应中被消耗。所以必须向含有有机物的水中加入足够量的氯，以便在与有机物反应完后仍有少量的氯过量与微生物反应。在水处理厂，操作员对处理后的水进行氯检测以测定氯的残留水平。对大部分的使用水来说氯适宜的残留水平为 0.2～0.6μg/ml。氯处理后的可饮用水被抽到储水池中，从储水池中通过重力或泵的动力流到由储水池和供应路线组成的分配系统（distribution system）中，直至用户。一定的氯残留水平保证处理水在到达用户之前不会发生污染（假如没有悲剧发生，如分配系统中的管子爆裂）。氯气即使溶于水中仍然极易挥发，可以在数小时内从处理后的水中消除。为了进一步确保在整个分配系统中始终有氯残留，大部分的市立水处理厂引进了氨气与氯反应形成一种稳定的，不易挥发的含氯化合物氯化铵，$HOCl+NH_3 \rightarrow NH_2Cl+H_2O$。

紫外线辐射也常被用来作为有效的消毒手段。就像我们在 22.2 节中讨论的，紫外线辐射用来处理从水处理厂流出的二级处理液。紫外线照射在欧洲饮用水运作中被广泛应用，目前美国也正在考虑这一应用。紫外光通常由水银蒸气灯产生。它们的能量输出在 253.7nm，这是一个能杀死细菌和病毒的波长（见 10.4 节）。但是用标准的紫外线辐射不能杀死原生动物如吸吮贾第虫属（*Giardia*）和隐孢子虫属（*Cryptosporidium*）的

包囊和卵囊。

紫外线辐射相对于化学消毒法例如加氯处理的优点有以下几点。①紫外线照射是一物理过程不会向水中引入化学物质；②接触时间短使得它可以应用于目前存在的流动系统中，资金耗费非常低；③大量的研究表明没有消毒副产品。尤其是在较小的系统中，处理水不被传输较长距离或保存较长时间（减少必要的氯残余），紫外线消毒对于加氯处理来说也许是一种更优越的方法。

概念检查

饮用水厂采用工业化物理和化学的手段来除去或抑制来自于自然、社区和工业的各种各样的生物的、无机的和有机的污染。水纯化厂采用澄清、过滤和消毒的过程来生产可饮用的水。可饮用的处理水不含有化学和生物污染。

◆ 描述饮用水处理厂的水处理，从进入直到各个分配点。

◆ 在饮用水处理过程中的沉淀、凝聚、絮凝和消毒各步的具体目的是什么？

Ⅱ 水体传播的微生物疾病

普通来源的传染性疾病是由于多人共用物品的微生物污染引起的。传染性疾病最常见的来源是污染了的水。这是因为在饮用水处理中的任何一个步骤出现问题就可能使成千上万的人受到感染。普通来源的水传播性疾病是发病率和死亡率的一个重要指标，尤其是在发展中国家。各种各样的细菌、病毒和原生动物可以导致水传播的传染性疾病。水体传播的疾病以传染性开始，即使只有很少数量的微生物存在，水即可导致传染。引起疾病所需的病原菌的具体数目取决于病原菌的毒性和宿主的抗感染能力。

28.4 水体引起感染的途径

人类病原体可以通过不恰当处理的饮用和烹饪水传播，另一个十分常见的传播途径是通过被病原体污染了的用于游泳和洗澡的水。

适于饮用的水

因为每个人都会通过饮用和烹饪来消耗水，所以水是病原菌传播的常见途径，并且，有潜在的灾难性传染性疾病传播的可能性。就像之前所讨论的一样，在发达国家水的供应通常有严格的质量标准，能有效地控制水传播疾病的蔓延。然而在发展中国家，由于水质量得不到保证仍会偶然暴发水传播性疾病。影响少数人的地方性暴发疾病有时是因为使用了不正规来源的污染水，如私人井或者来自溪流或湖泊的未处理水，这些来源的水可能被人类或动物的排泄物所污染。

水中传播的微生物一般说来在肠道内生长并通过粪便排出体外，粪便污染的水由此产生。另外，如果污染没有被检测到（如通过大肠杆菌检测法，见28.3节），并且没有通过消毒法除去，那么新的宿主可能会利用这样的水使得病原菌在肠道内繁殖并产生疾

病。在美国，有很多不同的细菌和原生动物病原菌偶尔通过饮用水传播（表 28.1）。我们将会在 28.7 节中介绍贾第鞭毛虫病和似隐孢菌病，但我们将在第 29 章中沙门氏菌病和大肠杆菌 O157：H7 的感染，我们将这些病原菌作为食物引起的传播进行介绍并讲述它们传播的普遍方式。

表 28.1 在美国暴发的与饮用水相关的传染性疾病[a]

疾病	媒介	暴发次数	病例数
沙门氏菌病	沙门氏菌种(*Salmonella* species)	2	208
贾第鞭毛虫病	肠内贾第鞭毛虫(*Giardia intestinalis*)	6	52
似隐孢菌病	微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)	1	5
急性肠胃病	大肠杆菌 O157：H7(*Escherichia coli* O157：H7)	4	60
	空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)	2	117
	大肠杆菌 O157：H7 和空肠弯曲杆菌	1	781
	小圆形病毒(small round virus)	1	70
	类诺沃克病毒(Norwalk-like virus)	3	356
	未知	17	416

a. 收集的 1999～2000 年的数据是由疾病控制和预防中心提供的。由于饮用水被感染性媒介污染所导致的传染性疾病共暴发 37 起，有 2065 起病例。其中由居民饮水系统引起的有 237 例（11.5%）；由非居民水系统如工厂、学校、游轮所引起的共计 1425 例（69%）。由个人水供应系统如水井、泉和溪流所引起的共计 403 例（19.5%）。

娱乐用水

娱乐用水包括淡水娱乐场所如池塘、溪流和湖泊，另外还有公共游泳池和涉水池。公共游泳池和涉水池的运行、消毒和过滤受国家和当地健康部门的管理。美国的环境保护机构对娱乐用淡水建立了指导方针（每月的几何平均数为肠道球菌≤33 个/100ml 或者大肠杆菌≤126 个/100ml），当然当地政府可以制定低于或高于这一标准的方案，因而，私人的或者是不正规的游泳池，温泉和浴盆都偶尔有可能是暴发水传播性疾病的途径。

在过去的 12 年中，美国平均每年暴发 13 起由于娱乐用水引起的水传播性疾病。表 28.2 根据产生的疾病将这些暴发性疾病进行了分类。

表 28.2 在美国与娱乐用水相关的暴发性传染病[a]

疾病	暴发数目	百分率/%
肠胃炎[b]	74	46.8
皮炎/角膜炎[c]	50	31.6
脑膜脑炎[d]	22	13.9
其他[e]	12	7.6

a. 收集的 1989～2000 年的数据是由疾病控制和预防中心提供的。

有 158 起娱乐用水传播的疾病暴发，大约每年暴发 13 起。

b. 大部分肠胃炎病例是由微小隐孢子虫（*Cryptosporidium parvum*）（见 28.6 节）、大肠杆菌 O157：H7（见 29.8 节），或者诺沃克因子样病毒（见 28.8 节）引起。

c. 大部分皮炎是由铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）引起。

d. 脑膜脑炎是由变形虫福纳氏虫（*Naegleria fowleri*）引起。

e. 其他的疾病包括由问号钩端螺旋体（*Leptospira interrogans*）引起的钩端螺旋体病，由军团杆菌（*Legionella*）引起的庞蒂亚克热（见 28.7 节）和由一些不明原因引起的呼吸感染。

发展中国家由水引起的感染

与美国和其他发达国家相反，全世界范围内水引起的感染是一个极为严重的问题。发展中国家经常会有一些不合格的水和污水处理厂，使得水的安全性和可饮用性受到限制，结果，像霍乱（见 28.5 节）、斑疹伤寒和阿米巴病等（见 28.5 节）成为世界范围内严重的健康问题。

概念检查

饮用水和娱乐用水都有可能成为水传播病原菌的途径。在美国，由于两者的任何原因所引起的疾病数对庞大数量的暴露水而言是相对较少的。世界范围内，足够的水处理厂和干净水来源的匮乏显著增加了传染性疾病的蔓延。

- 指出由于饮用水污染而暴发疾病最相关的微生物。
- 指出由于饮用水污染而发生疾病（很多为传染病）最相关的微生物。
- 指出最有可能由于娱乐用水污染而导致疾病暴发的生物体。

28.5 霍乱

霍乱是一种严重的腹泻疾病，目前在世界发达地区已经受到了严格控制。霍乱是一种重要的水传播性疾病，但可以通过采用合适的水处理措施得以控制。

生物学和流行病学

霍乱（Cholera）是由霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）引起的，霍乱弧菌是一种革兰氏阴性的弯曲杆菌（见 12.12 节），主要通过污染的水传播。然而，与许多水传播性疾病相比，霍乱也与食物相关。例如，在美国就发现霍乱与吃生的有壳水生生物和生食蔬菜有关，这可能是由于用污水清洗蔬菜或是来自污水中的水生物造成的。

自 1817 年，霍乱已在世界范围内流行过 7 次。已鉴定霍乱弧菌有两种生物型：古典型和 *El Tor* 型。1961 年发生在印度尼西亚的第 7 次霍乱流行病主要是由霍乱弧菌 O1E1 引起的，并且一直蔓延到现在。1992 年，一种遗传变种霍乱弧菌 O139 孟加拉血清型在孟加拉国出现并引发了一场大范围的流行。2001 年，全世界有 184 311 报道病例，其中 2728 人死亡，其中 94%的疾病发生在非洲。1961 年的流行病有 5 000 000 人患霍乱并有超过 250 000 人死亡。

霍乱流行于非洲、东南亚、印度和中南美洲。流行病霍乱在一些污水处理不充分或者没有污水处理的地区频繁发生，即使是在发达国家这种病仍是一种威胁。过去十年，美国有零星的霍乱流行病暴发（总数少于 250 例），大部分在海湾沿岸。目前美国每年有少于 5 例的病例报道，这些病例极少是由于饮用水引起的。生贝类似乎是最常见的传播媒介，可能是因为霍乱弧菌具有区域性，作为一种普通菌群生长在海湾水中（图 28.9）。

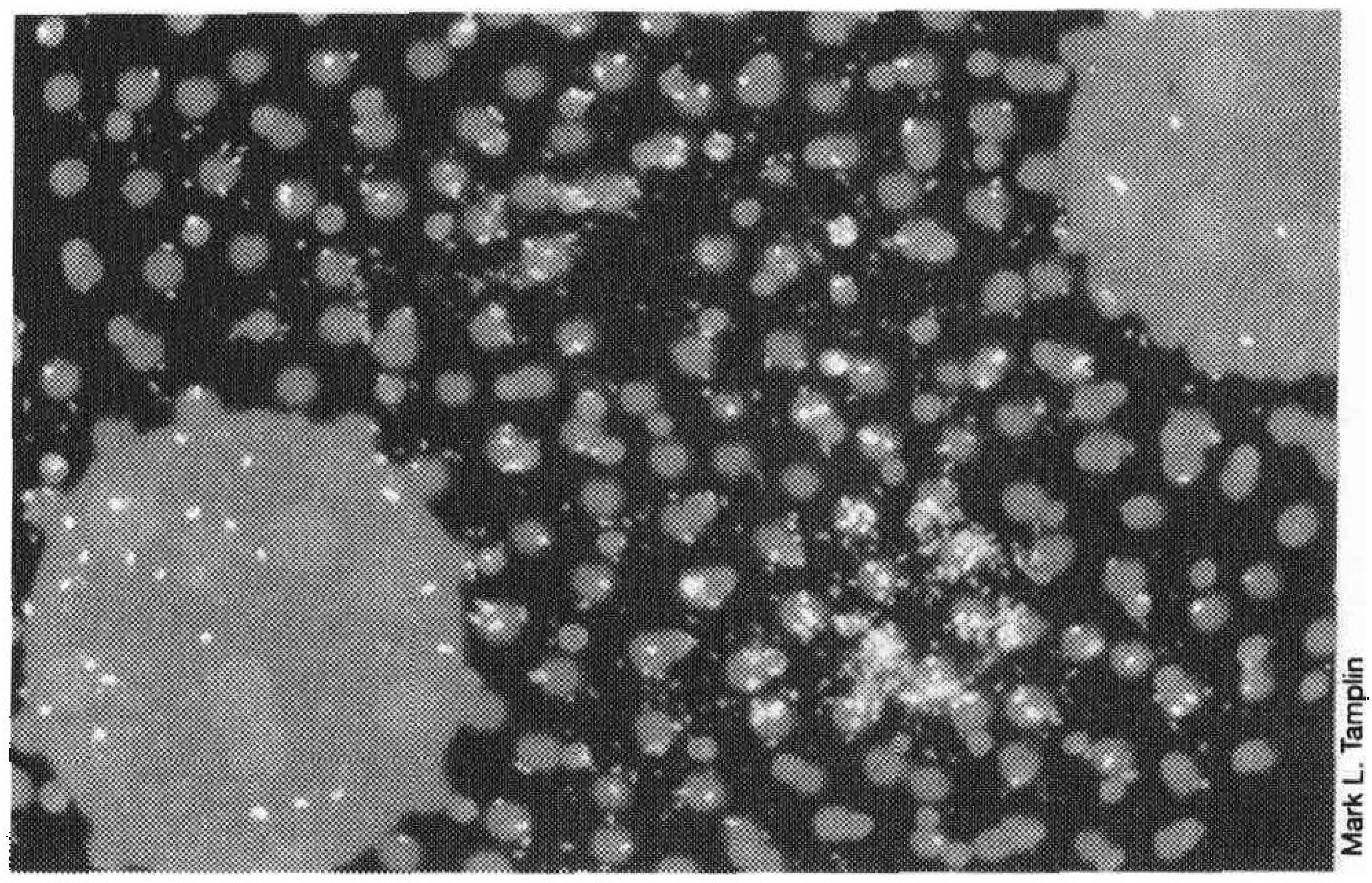


图 28.9　吸附在一种水生藻类——团藻表面的霍乱弧菌细胞。这是来自孟加拉国霍乱流行地区的分离物。霍乱弧菌细胞被细菌细胞表面蛋白质的单克隆抗体染成绿色。红色为藻类中的叶绿素荧光所致。

发病机制

霍乱弧菌一旦被吞入，它的细胞就开始在小肠内定居。对志愿者的研究表明，胃酸的存在对于引起霍乱的菌量有影响，即一般情况下摄入 10^8～10^9 个霍乱弧菌会引起霍乱，但那些用碳酸氢钠中和胃酸的志愿者只需摄入 10^4 个霍乱弧菌就会发病；如果霍乱弧菌与食物一起摄入，所需引起发病的数目更少，可能是食物可以保护霍乱弧菌免受胃酸影响。

霍乱弧菌与小肠表皮紧紧相贴生长并释放肠毒素（见 21.11 节）。霍乱肠毒素可以引起严重的腹泻并且导致脱水甚至死亡，除非给予患者流体和电解液疗法。这种肠毒素可以导致每天失水 20L（20kg 或 44lb）。霍乱如果不加以治疗其死亡率可达 25%～50%，而在一些严重拥挤和营养不良的地区死亡率还会更高。

诊断、预防和治疗

霍乱是通过患严重腹泻患者的粪便中是否含有革兰氏阴性、弧状的霍乱弧菌来确诊的（图 28.10）。

免疫作用对于预防霍乱基本无效。自然感染和流行疫苗仅能提供有限的、短期的免疫。没有疫苗可以对抗霍乱弧菌 O139 血清型。公共健康措施充分的污水处理和可靠安全的饮用水源是预防霍乱的重要措施。在合适的污水处理和饮用水纯化过程中霍乱弧菌可以从废水中完全去除。对于个人到霍乱流行地区旅游，应避免与未处理水、生食物、生鱼和有壳水生生物接触。

治疗霍乱的最有效方法是静脉或口服流体和电解液替换疗法（20g 葡萄糖，4.2g NaCl，4.0g $NaHCO_3$，1.8g KCl 溶于 1L 水中）。口服疗法最受欢迎因为不需要特殊的设备和消毒预防。有效的治疗能减少死亡率约到 1%。链霉素或四环素可以缩短霍乱的过程，但如果没有相应的流体置换疗法，抗生素也没有任何作用。

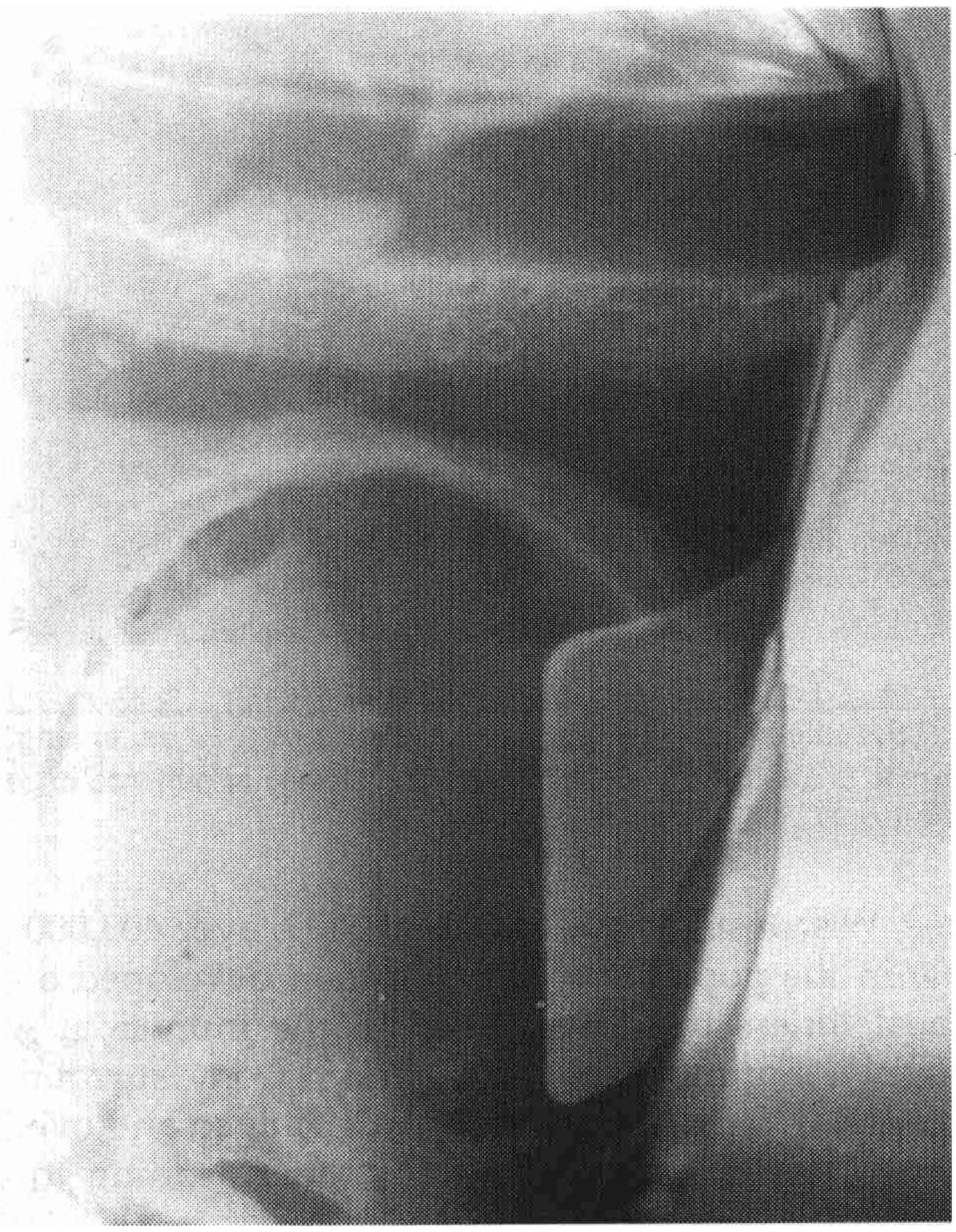


图 28.10 霍乱患者的粪便样品。患者的“粥样”大便几乎是液体的。位于底层的固体物质为黏液。霍乱患者这种与血液相同浓度的大便中含有大量的 Na^+、K^+ 和 HCO_3^-，并且含有大量的霍乱弧菌细胞。霍乱弧菌的生物学特性和新陈代谢在 12.12 节中介绍，霍乱毒素的作用显示在图 21.22 中。

概念检查

霍乱弧菌是一种可以引起霍乱，急性腹泻的病原菌，可导致严重脱水。霍乱以流行病的形式发生。目前这种流行病在美洲、印度、亚洲和非洲是一种地方病。在这些地区适当地注意，避免污染的水和食物是合理的预防措施。采用口服电解液法治疗是治疗这种疾病的最有效方法，可降低死亡率约到 1%。

- 阐述在流行地区预防霍乱的措施。
- 阐述患霍乱最可能的条件。
- 阐述治疗霍乱的特殊方法。

28.6 贾第虫病和似隐孢菌病

贾第虫病（giardiasis）和似隐孢菌病（cryptosporidiosis）分别由原生动物吸吮贾

第虫（*Giardia lamblia*）和微小隐孢子虫（*Cryptosperidium parvum*）引起。这些生物有机体即使是在处理良好的水中仍然是个问题，因为它们几乎存在于所有的表面水中并且极度抗氯。

贾第虫病

吸吮贾第虫是具有鞭毛的原生动物（见 14.10 节），尽管贾第虫病也可以通过食物传染和性传播，但主要通过污染的水传给人类。贾第虫病是由原生动物寄生虫引起的急性胃肠道疾病（图 28.11）。这种原生动物细胞称为营养体（图 28.11a），进入休眠状态称为孢囊（cyst）（图 28.11b）。孢囊有一层厚的保护层可以使病原菌抵抗干燥和化学侵袭。当通过污染的水被摄入后，孢囊萌发，吸附在肠壁上并引起贾第虫病的症状：暴发性腐臭水样腹泻、肠道痉挛、胃肠胀气、恶心、体重减轻和不适，症状表现为急性或慢性。腹泻的腐臭味，以及大便中的缺血或黏液有助于将贾第虫病和其他细菌、病毒引起的腹泻加以区分。很多感染的人没有表现症状，仅显示感染携带者。

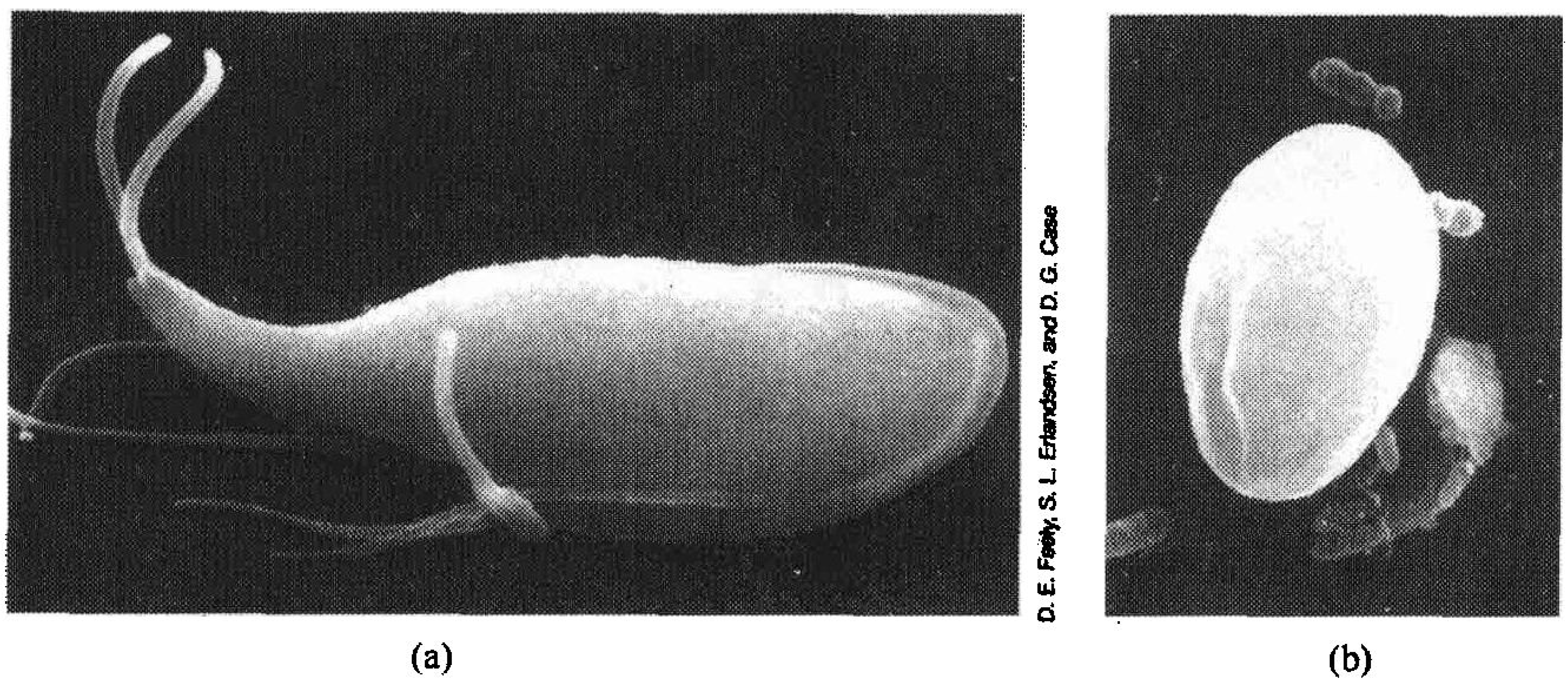


图 28.11 寄生虫吸吮贾第虫的扫描电子显微图。（a）可运动的营养体。该营养体大约 15μm 长。（b）孢囊。该孢囊大约 11μm 长。该原生动物有趣的发展史见 14.9 节。其生物学见 14.10 节。

最近在美国暴发的饮用水传染病中吸吮贾第虫感染占 6/37（表 28.1）。贾第虫病也可以由于误饮游泳池水或湖泊中的感染水引起。在美国的表面水源中（湖泊、池塘和溪流）97%含有吸吮贾第虫孢囊。具有厚厚外壁的孢囊可以抵抗氯气和紫外线处理，很多疾病的暴发都是因为只用氯气作为水纯化的方法。那些经过适当沉淀、过滤、氯气处理的水中是没有吸吮贾第虫的孢囊的。

一些贾第虫病例也与野生地区未处理的饮用水有关。海狸和麝鼠是吸吮贾第虫的主要携带者，它们可以把细胞或孢囊传播到水体中，当人类摄入时就会引起感染。为安全起见，所有从河流或小溪中获得的水，如在野营或登山旅行中，都应当加以过滤，用碘或氯处理，或煮沸。煮沸是一种较好的除去微生物的方法。

实验室诊断法包括观察粪便中的吸吮贾第虫孢囊或采用 ELISA（酶联免疫荧光标记，见 24.10 节）检查粪便中的吸吮贾第虫抗体。药物奎纳克林、痢特灵和灭滴灵对于治疗这种急性病十分有效。

似隐孢菌病

原生动物微小隐孢子虫（*Cryptosporidium parvum*）是各种各样恒温动物的天然寄生虫。这种寄生虫是周长 2～5μm 长的双孢子球菌，寄生在胃肠黏膜上皮细胞内。这种原生动物产生厚壁，具有抗氯性，有感染卵囊，可以大量散发到水中侵染热血动物（图 28.12）。当其他动物饮用这种粪便污染的水时感染便被进一步传播。隐孢子虫属（*Cryptosporidium*）的孢囊高度抗氯（高达抗氯的吸吮贾第虫抗性的 14 倍）和紫外线辐射消毒，因此除去它可以靠沉淀和过滤的方法。

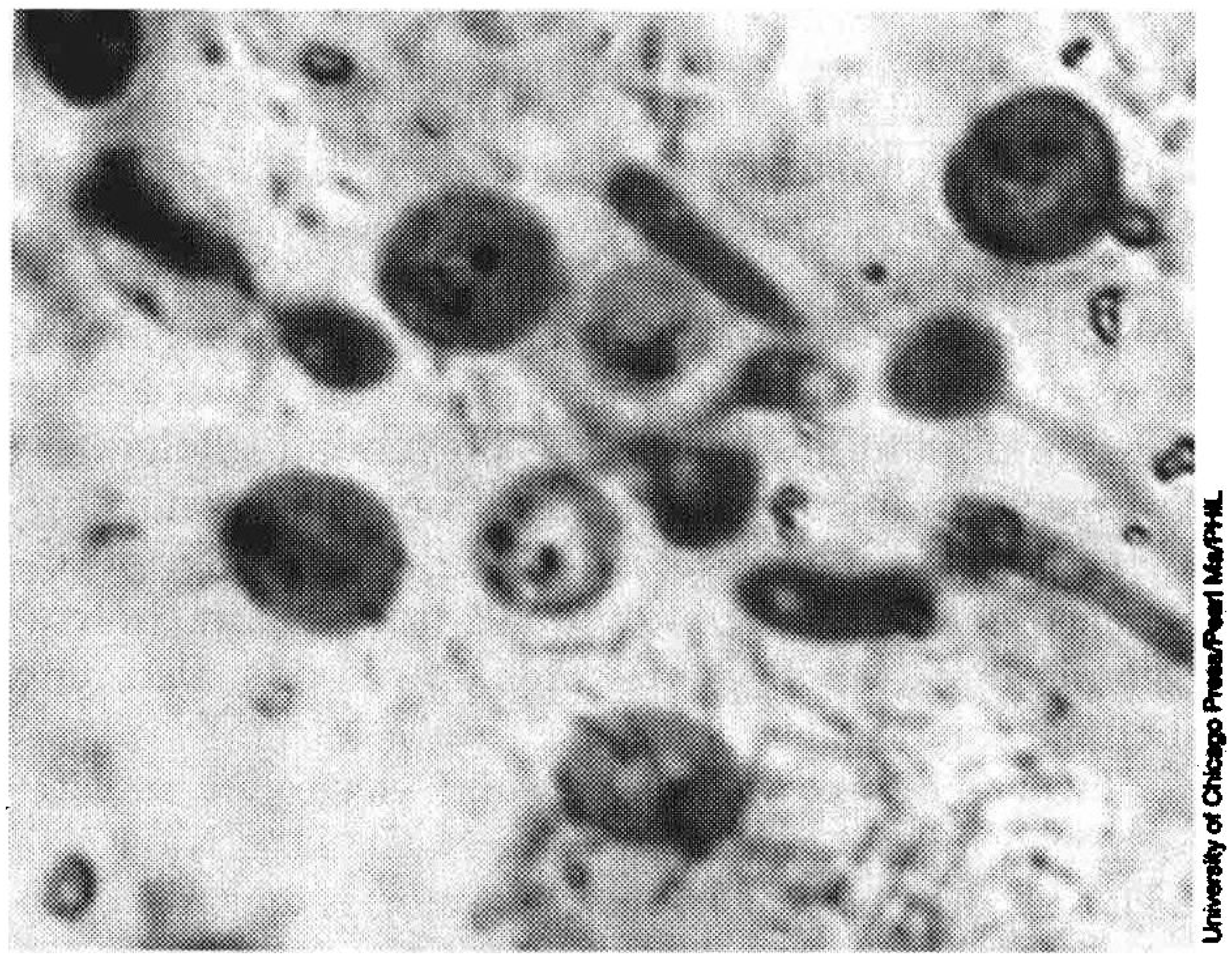


图 28.12 显示隐孢子虫属卵囊的抗酸染色的排泄物涂片。这个有厚壁的卵囊被染成红色，直径 3～5μm。隐孢子虫，一种专性胞内寄生虫，是原生动物家族 Sprorozoa（见 14.10 节）中的一员。

美国记录的最大一次水传播性疾病的暴发就是由微小隐孢子虫引起的。在 1993 年春天威斯康星州密尔沃基市的 1 600 000 人中，超过 403 000 人由于城市供水而导致腹泻。春雨和周围环境的水土流失到密歇根湖加重了水纯化系统的负担，导致了微小隐孢子虫的污染。这种原生动物是产奶牲畜的主要肠道病原体，是该疾病的最可能来源。

似隐孢菌病是可自我控制的腹泻，并且在正常个体中两星期或更短的时间内可痊愈。但那些免疫系统衰退的人，如 AIDS 病患者、幼儿和老人可能发展成严重的并发症。在密尔沃基市暴发事件中，约有 4400 人得到了治疗，一些人死于并发症，如严重脱水。

密尔沃基市的暴发指出了那里水纯化系统的弱点，即大量供水系统失败后，需不断地监测和管理水系统。从经济角度看，这次流行病使密尔沃基市的居民药物及生产力损失超过 96 000 000 美元。

似隐孢菌病的实验室诊断方法包括粪便中似隐孢子虫属孢囊的观察（图 28.12）。对于有正常免疫力的人来说是不需要治疗的。对于正接受免疫抑制治疗（如强的松）的个体，建议停止免疫抑制的药物；对于免疫力损伤的个体，应给予补充治疗（如静脉注射流体或电解液）。

概念检查

贾第虫病和似隐孢菌病分别是通过被已感染的人或动物的粪便污染饮用水或娱乐用水，使其中含有的吸吮贾第虫和隐孢子虫属的抗氯孢囊来传播。感染其中任何一种寄生虫都可能引起腹泻，并且可能对某些人产生更严重的疾病。

◆ 解释吸吮贾第虫和隐孢子虫属的孢囊对于生存和感染的重要性。

◆ 为什么即使是在发达国家原生动物经常与水传播性疾病相关？概述减少它们影响的步骤。

28.7 军团杆菌病

引起军团杆菌病（legionellosis）的细菌嗜肺军团菌（*Legionella pneumophila*），是一种重要的水传播性病原菌，通常通过浮质传输而不是饮用水或娱乐用水（见 25.11 节）。

生物学和流行病学

嗜肺军团菌是 1976 年夏天在费城的一次美国军团会议上作为引起肺炎暴发的病原菌发现的。嗜肺军团菌是一种细长的、革兰氏阴性、专性好氧的杆状菌，有复杂的营养需求，其中包括不常见的高铁条件（图 28.13）。嗜肺军团菌可以通过免疫荧光技术检测（见 24.9 节），并且可以从陆地和水中或者是从患军团杆菌病的患者身上分离得到。

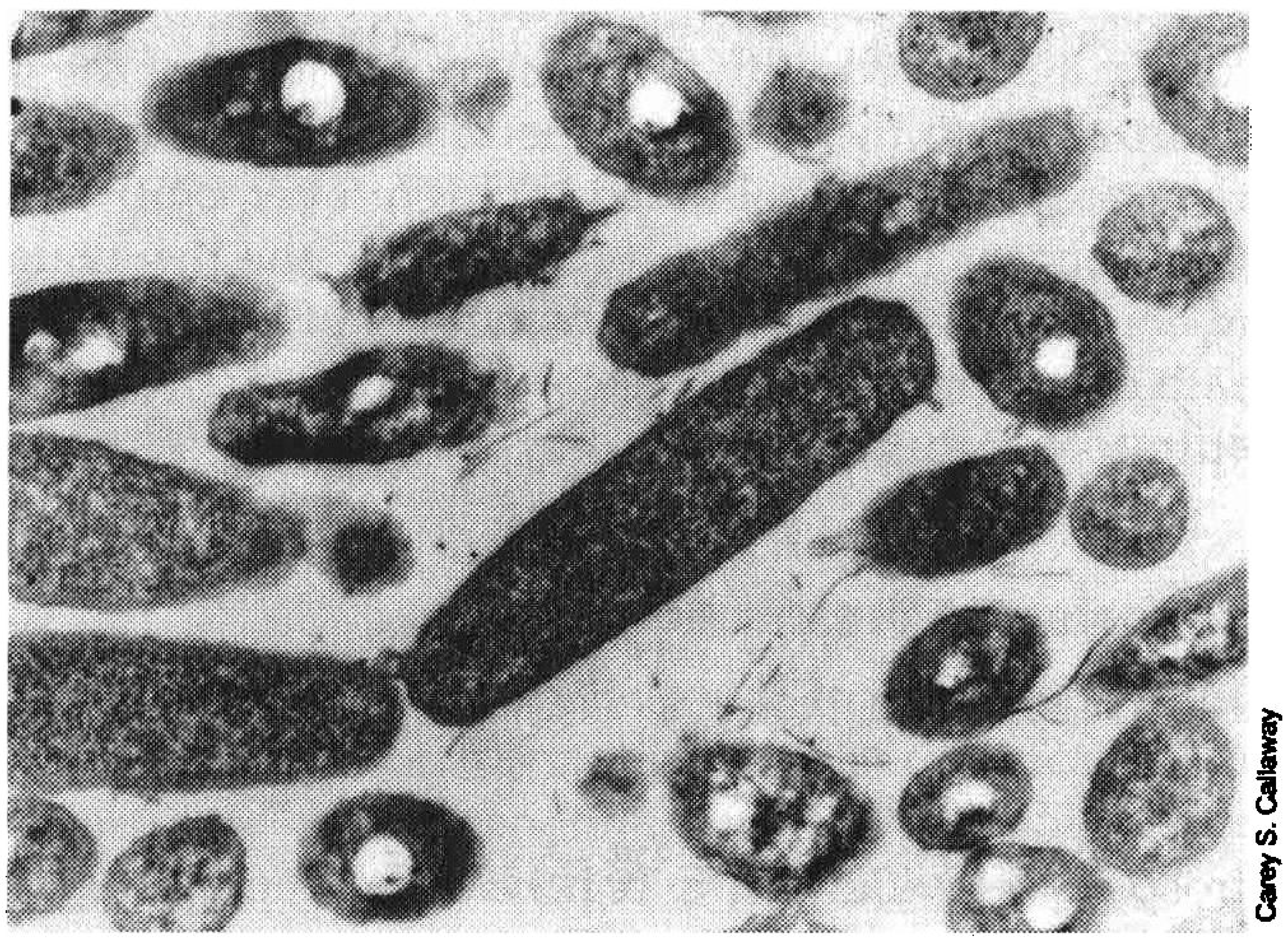


图 28.13　嗜肺军团菌引起军团杆菌病。图示嗜肺军团菌超薄切片的透射电镜照片。细胞长 2μm，直径 0.3～0.6μm。细胞中白色小泡为 β-羟丁酸多聚体，是它们储存碳源的结构。

嗜肺军团菌在湖泊、溪流和土壤中的存在数量很少。它对热和氯均有一定的抗性，所以可以通过水分配系统传播。它通常大量出现在大型空气调节系统的冷却塔和蒸汽冷凝器中。这种病原菌生长在水中并且散布在潮湿的空气浮质中。人类感染是通过空气产

生的小滴。但这种感染不能通过人与人之间传播。该病的多发期并趋于高峰期均是在已经使用空调几个月后的夏季中晚期。

嗜肺军团菌存在于热水塘和涡流温泉区，在温和的（35～45℃）、不流动的水中大量生长。流行病学研究表明嗜肺军团菌感染可能会发生在一年的任何时候，当吸入在冷热交替系统中产生的空气浮质和淋浴、盆浴时，最容易感染。总之，军团杆菌病的报道在美国已经达到每 100 万中有 4～6 例，但是高达 90%的实际病例可能没有被诊断或者没有被恰当地报道。军团杆菌病的预防可以通过改善水依赖的冷热循环系统和水运输系统的设计。这种病原体可以通过高氯处理或者是加热至 63℃以上，从供水中去除。

发病机制

嗜肺军团菌是一种胞内寄生菌，侵入并生长在肺泡的巨噬细胞和单核细胞中（见 22.22 节）。感染经常是无症状的，或者是产生轻度咳嗽、喉咙痛、轻度头疼和发热。这些轻度的、自身限制的症状称为 Pontiac 发热，不需治疗并且可在 2～5 日内痊愈。但是，严重的感染常会发生在抵抗力已经损害的老人身上并导致肺炎。一些嗜肺军团菌的血清型（已知的有十多种）都与肺炎感染的形成有着密切的关系。在肺炎出现之前，常出现肠道紊乱，接着是高烧、寒颤和肌肉疼痛。这些症状之后是干咳、胸部和腹部疼痛。死亡率达 10%，通常是由于呼吸衰竭而致。

诊断和治疗

嗜肺军团菌的临床检测通常是通过支气管的洗涤物、胸膜流液或其他体液的培养物来检测的。血清（抗体）检测作为军团杆菌病的辅助证据。作为辅助检测，嗜肺军团菌有时候可以在患者的尿液中检测到。嗜肺军团菌对抗生素利福平和红霉素敏感。静脉注射和电解液疗法适用于所有病例。

概念检查

嗜肺军团菌是引起军团杆菌病和 Pontiac 热的呼吸道病原体。嗜肺军团菌在温水中大量生长并通过空气浮质传播。军团杆菌病没有减少并且感染数被低估了。

- 指出嗜肺军团菌的来源。
- 阐述控制嗜肺军团菌的具体措施。

28.8　似斑疹伤寒和其他水传播的疾病

各种各样的细菌、病毒和原生动物可以导致常见的水传播性疾病。这些疾病是产生发病率的关键，尤其是在发展中国家。在此我们简要地介绍几种重要的水体传播性疾病。

似斑疹伤寒

在全球范围内，可能通过水传播的最重要病原微生物是引起似斑疹伤寒（typhoid fever）的伤寒沙门氏菌（*Salmohella typhi*）和之前介绍过的引起霍乱的霍乱弧菌

(*Vibrio cholerae*)。虽然似斑疹伤寒也可通过污染的食物（见 29.7 节）或患者的直接接触传播（见 25.4 节），但最常见和最严重的世界范围内的传播途径仍然是水。幸运的是似斑疹伤寒最终已在发达国家灭绝，主要归因于有效的水处理方法（图 28.2）。在美国，普通年份的病例少于 400，但是就像在 28.1 节中所讨论的，似斑疹伤寒在饮用水被常规的过滤和氯化处理之前，对公共健康仍是一个主要威胁。但是，净化水的方法一旦遭到破坏，即洪水、地震及其他自然灾害中的水污染或污水泄漏造成的水污染都会导致似斑疹伤寒的流行，即使是在发达国家也是如此。

病毒

病毒同样可以通过水传播并引起人类疾病。非常普通的肠道病毒像脊髓灰质炎病毒 (poliovirus)（见 16.8 节）、类诺沃克病毒（Norwalk-like virus）（表 25.8）和甲型肝炎病毒（hepatitis A virus）（见 26.11 节）都通过排泄物散落在水中。其中最严重的是脊髓灰质炎病毒，但野生的脊髓灰质炎病毒已在西半球灭绝（见 25.9 节）。尽管病毒可以在水中存活相当长一段时间，但它们经水消毒剂（如氯气）处理后就丧失活性。水中 0.6mg/L 的含氯量就能保证病毒被破坏。

阿米巴病（Amebiasis）

许多阿米巴变形虫寄居在人类和其他脊椎动物的组织中，通常在口腔和消化道中，其中一些是致病的。我们在 14.10 节中介绍了阿米巴样原生动物的一般特点。

溶组织内阿米巴（*Entamoeba histolytica*）在世界范围内是一种可以传染给人类的致病原生动物，主要通过污染的水，有时也通过污染的食物传播（图 28.14）。溶组织内阿米巴是一种厌氧的变形虫，它的营养体缺乏线粒体。与贾第鞭毛虫一样，溶组织内阿米巴的营养体也会产生孢囊。孢囊在肠道内萌发，可在肠黏膜细胞表面或细胞内生长。许多感染是无症状的，但持续生长将导致肠黏膜溃疡，造成腹泻和严重的消化道痉挛。腹泻可以发展为肠壁发病，即通常所说的痢疾，它的特点是肠炎、发热，以及从消化道排出的排泄物中含有血液和黏液。如不加以治疗，溶组织内阿米巴的营养体会迁移至肝，有时至肺和大脑。在这些组织的生长会造成严重脓肿甚至发生死亡。世界范围内，每年有多达 100 000 的人死于变形虫痢疾。这种疾病在世界上的热带和亚热带国家极为普遍，每年至少有 50 000 000 的人会患上腹泻，并且还有 10 倍多的人患上无症状的疾病。在美国，每年有几百例，大部分发生在西南部的边境附近。

溶组织内阿米巴引起的侵入性疾病可以用药物脱氢吐根盐（dehydroemetine）来处理，对于特定无症状病例，如对免疫损害的个体可以用药物糠酸二氯尼特酯（diloxanide furoate）处理，但阿米巴性药物并不总是有效。暂时性的治愈是可以的，也就是说宿主的免疫系统在结束感染中发挥了一定的作用。但初次感染并不保证产生保护性的免疫，因为再次感染并不罕见。这种疾病在那些污水处理充分的地区发病率很低。无有效的污水处理以及使用未经处理的地表水做饮用水是造成阿米巴病的常见原因。

实验室诊断包括粪便中溶组织内阿米巴孢囊、组织中营养体显示或者用 ELISA（酶联免疫吸附测定，见 24.10 节）显示血液中痢疾内变形虫的抗体。

福纳氏虫（*Naegleria fowleri*）也能引起阿米巴病，但方式非常不同。福纳氏虫



图 28.14 溶组织内阿米巴的营养体——阿米巴病的病因。注意图中深色的核。红色的结构是血红细胞。营养体的长度为 12～60μm，关于阿米巴生物学的介绍参见 14.10 节。

是在土壤和小溪流水中发现的一种自由生长的变形虫。福纳氏虫感染通常是由于在夏季土壤污染的水源（如温泉或湖泊和溪流）中游泳或洗澡引起的。这种自由生长的变形虫通过鼻子进入人体并直接穿梭至大脑。这种生物体繁殖引起深层出血和大脑损伤（图 28.15）。这种情况称为脑膜脑炎（meningoencephalitis）。通常在一周内死亡。在过去的 12 年中，美国暴发了 22 起因娱乐用水引起的脑膜脑炎（表 28.2）。1999～2000 年，暴发了 4 起，每次都有一人是由于夏天在湖泊、池塘或溪流中游泳或涉水而感染的。

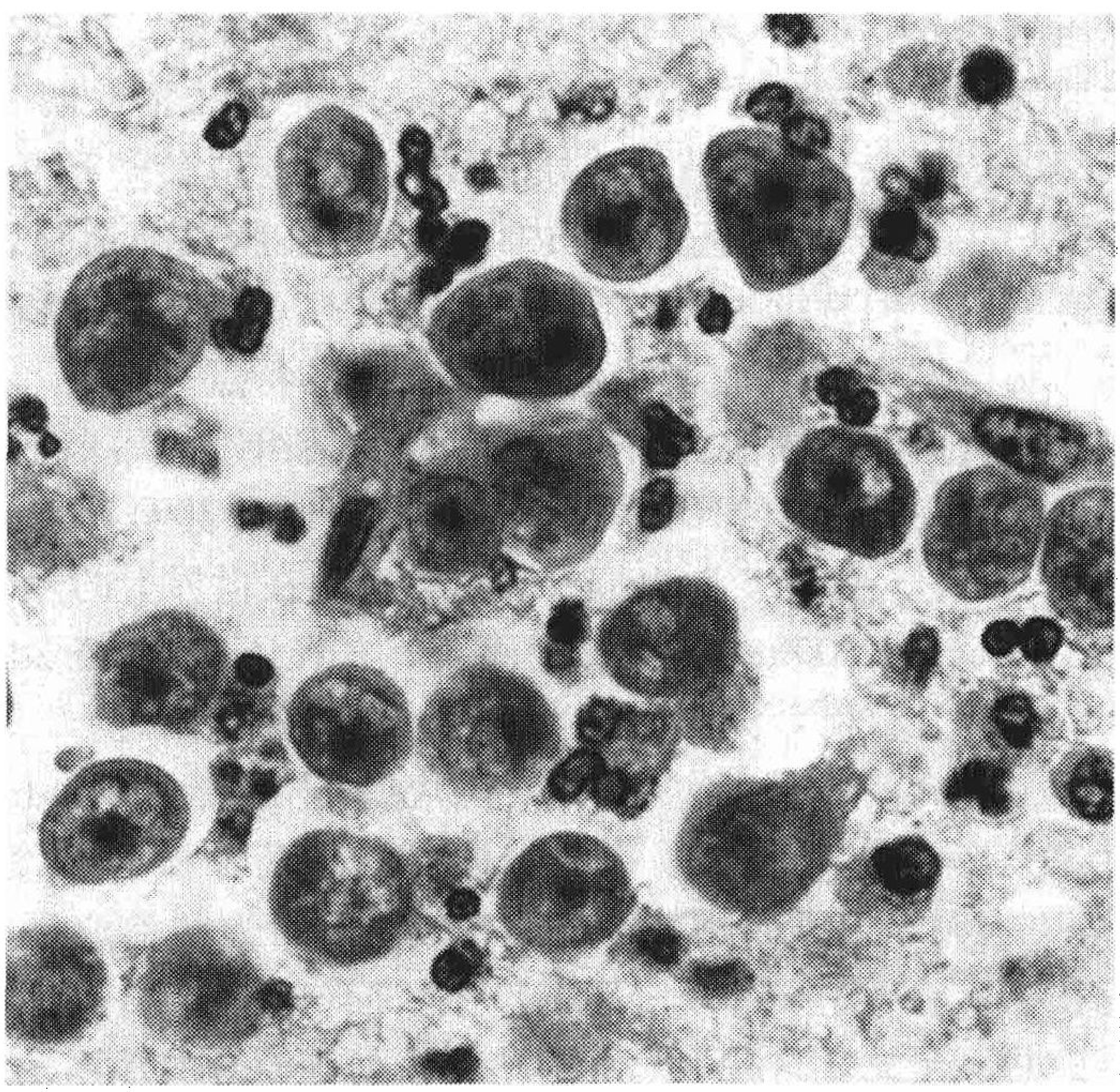


图 28.15 福纳氏虫的营养体在脑组织中引起脑膜脑炎。大批圆形、卵圆形或阿米巴态的营养体的核被深蓝色染色。图示的脑组织已经被破坏殆尽。单个营养体长 10～35μm，关于阿米巴生物学的介绍参见 14.10 节。

福纳氏虫感染的诊断需在脑脊髓液中观察到变形虫。如果能迅速做出正确诊断，可用药物两性霉素 B 来成功治疗。

概念检查

似斑疹伤寒、病毒感染和阿米巴病都是重要的水体传播性疾病。水引起的似斑疹伤寒和病毒性疾病在发展中国家仍非常普遍，但已经在发达国家通过有效的水处理得到了控制。由痢疾内变形虫引起的阿米巴痢疾是影响成千上万人的世界性问题。脑膜脑炎是由福纳氏虫引起的罕见但很严重的疾病。

◆ 解释有效的水防疫对于人类疾病传播的影响，如通过粪便污染的供应水传播的斑疹伤寒和脊髓灰质炎。

◆ 描述能够用于消除或减少由痢疾内变形虫引起的阿米巴病或由福纳氏虫引起的脑膜脑炎的公共健康方法。

复习题

1. 给大肠菌群下个定义并解释大肠菌群的检测。为什么大肠菌群的检测可用于评价饮用水的指标？（见 28.1 节）
2. 描述一个典型的处理厂中废水的纯化。总的 BOD 减少的是指什么？（见 28.2 节）
3. 明确用于处理饮用水的方法。在这个过程中每一步主要除去的是哪种污染物？（见 28.3 节）
4. 指明水引起感染的主要途径。对于公共健康而言为什么感染的常见途径如此危险？（见 28.4 节）
5. 为什么抗生素对于治疗霍乱无效？通常用什么方法来治疗霍乱？（见 28.5 节）
6. 贾第虫病和似隐孢菌病即使是在有严格水质量标准的地区仍然是重要的公共健康问题。为什么？请解释。（见 28.6 节）
7. 描述军团杆菌病（legionellosis）的主要特征。这种疾病和其他水体引起疾病的主要区别是什么？（见 28.7 节）
8. 指出在发达国家用于控制水系统中沙门氏菌病、类诺沃克病毒和阿米巴病病原体的方法。（见 28.8 节）

应用题

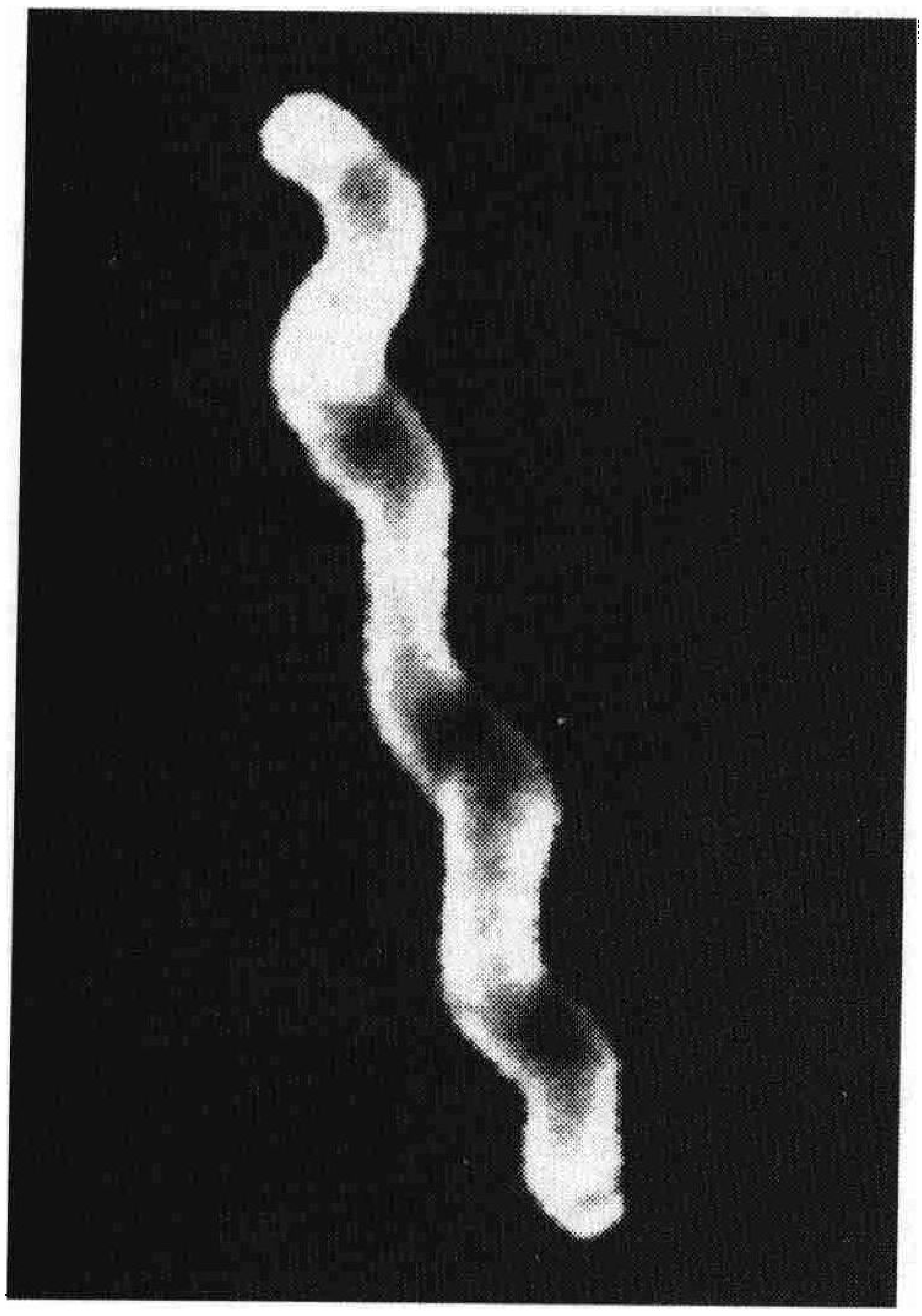
1. 为什么废水中 BOD 的降低是废水处理的首要目标？如果废水在被排放到当地水源如湖泊或溪流中之前，其中的 BOD 不被显著降低将会怎样？
2. 在美国，联邦政府已经制定了一套严格的饮用水标准。这些标准以法律形式执行。然而，娱乐用水标准没有被严格规范。解释为什么娱乐用水标准更宽松，并且为你所居住的地区设计一个娱乐用水标准。

3. 霍乱有一个悠久并且复杂的与人类相互作用的历史，并且在今天仍然是一种严重的水体传播性疾病。并且，在世界范围内均有暴发、传播。通过世界卫生组织、疾病控制和预防中心等类似组织来明确关于这种流行病的地理分布和最近暴发的有关数据。提出每年能够减少霍乱蔓延并且予以控制地方性暴发的方法。霍乱能根除吗？
4. 霍乱为某个国家的地方性疾病，作为一名游客，你将会采取哪些具体措施来减少感染霍乱的危险？这些预防也能防止你感染其他的水传播性疾病吗？哪一种？明确你的预防措施不能防止哪种水传播性疾病的感染。提出更进一步的建议来预防那些疾病。
5. 为什么多种原生动物的包囊能污染表层水？公共健康的机构采取哪些措施来解决这个问题？
6. 讨论废水和饮用水处理中必须具备的对似斑疹伤寒这类疾病进行控制的系统设备。我们有可能像消除脊髓灰质炎病毒那样来消除伤寒沙门氏菌吗？我们有可能，或者非常谨慎地说，消除福纳氏虫（*Naegleria fowleri*）或者溶组织内阿米巴（*Nntamoeba histolytica*）吗？做出解释。

（宋存江　译，李国强　校）

29

食品保存和食源性微生物疾病



整个世界范围内食品传染和食品中毒是造成疾病和死亡的重要原因。电镜照片显示的是空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)，所污染的生的食品和即食食品造成食品传染。

词汇表

肉毒中毒（botulism）：因摄取含有肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）所产毒素的食物而引起的食物中毒

罐装（canning）：在密闭容器中封装食物并通过加热杀死其中的微生物的过程

发酵（fermentation）：在缺乏外界电子受体的情况下，有机化合物（通常是碳水化合物）的厌氧性分解代谢过程

食物传染（food infection）：由于摄取被病原体污染的食物导致感染而引起的疾病

食物中毒（food poisoning，food intoxication）：由于摄取已经含有微生物毒素的食物而引起的疾病

食物腐败（food spoilage）：食品在外观、气味及口味上的变化，使之不能被消费者接受

辐射（irradiation）：将食品暴露在电离辐射之下，以达到抑制微生物和有害昆虫生长或延迟成熟的目的

李斯特氏菌病（Listeriosis）：由单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）引起的胃肠道食源性感染，可能导致菌血症和脑膜炎

冻干法（冷冻干燥）（lyophilization，freeze-drying）：真空抽除冷冻食品中全部水分的过程

不易腐食品［nonperishable（stable）food］：拥有延长的保存时间并能够抵抗微生物所造成腐败的低水活度食品

易腐食品（perishable food）：通常是高水活度的新鲜食品，由于易于滋生微生物导致腐败，保存期很短

腌制（pickling）：酸化食物的过程，以防止微生物生长和腐败

沙门氏菌病（salmonellosis）：由超过 2000 个变种的沙门氏菌属（*Salmonella* spp.）中的任一种所引起的小肠结肠炎

半易腐食品（semiperishable food）：由于会滋生微生物导致腐败，只拥有有限的保存时间的中等水活度食品

水活度（water activity，a_w）：水在代谢过程中的可用性

食源性疾病是微生物界关注的新兴领域。微生物在我们的食品供应中具有重要作用。微生物在我们生存的环境中无处不在，在水、空气甚至食品中均可发现它们的踪迹。新鲜食品，多数加工食品甚至罐头食品都可被微生物污染。但某些食品却需要活性微生物。许多食品是由微生物作用生产和加工的。例如，干酪、酪乳、酸奶油和酸奶酪等奶制品都是通过微生物发酵制成的。Sauerkraut（一种德国泡菜）是一种发酵的蔬菜食品；香肠、肉酱、肝酱等肉制品的生产也需要微生物发酵技术；苹果酒是由乳酸菌生产的（见 30.11 节），酒精饮料通过酵母发酵制得（见 30.13 节）。在第 30 章我们以工业标准详细介绍了利用微生物生产的可食用食品。

本章中，我们着重讨论微生物生长对食品的负面影响。预想不到的、不可控制的微生物生长破坏了大量食物，从而引起严重的经济损失和大量的营养流失。摄取被特殊微生物或微生物产物污染的食物可导致食品传染病和食品中毒。

Ⅰ 食品保存和微生物生长

首先我们讨论微生物是食品的主要破坏者，而后我们提出了各种控制微生物生长保存食品的方法。

29.1 微生物生长和食品变质

大量的微生物，包括一些人类病原菌在普通食品上生长和繁殖。许多食品提供了适宜微生物生长的环境，而微生物的生长通常会降低食品的质量和利用率。

食品变质

食品变质（food spoilage）是指食品的外观、气味、口感发生变化而使消费者不能接受。变质食品不一定是不安全的，它一般是指消费者不会购买和食用味道变差的食品。变质食品在质量、品质和价格上的下降引起生产者、经营商和消费者的经济损失。

由于食品是有机物，它们为各种有机化能营养菌提供生长的营养。食品的物理和化学特性决定了它们受微生物感染的程度。依据变质的难易程度，食品主要分为三类：①易变质食品（perishable food），包括许多新鲜食品类；②半易变质食品（semiperishable food），如土豆和坚果；③稳定的和不易变质食品（stable or nonperishable food），如面粉和糖（表 29.1）。

表 29.1 依据储存能力对食品分类

食品分类	实例
易变质型	肉、鱼、家禽、鸡蛋、牛奶、大多数水果和蔬菜
半易变质型	土豆、一些苹果和坚果
不易变质型	糖、面粉、大米和干豆

这种食品分类主要取决于食品的湿度，而湿度与水活度（water activity，a_w）相关（见 6.14 节）。水活度是代谢过程中的可用水。不易变质食品具有低水活度，可长时间储存而不变质。易变质食品和半易变质食品具有较高水活度，它们必须储存在某种条件下以阻止微生物的生长。

新鲜食品易被真菌和细菌破坏，不同类型的食品上生存的微生物也不同（表 29.2）。由于不同食品的化学性质差别较大，因此不同食品上生存着特定的可最大程度利用其营养的微生物。

例如，沙门氏菌（*Salmonella*）、志贺氏菌（*Shigella*）和大肠杆菌（*Escherichia*）等是生活在动物的内脏中的肠道菌，对水果和蔬菜的影响很小，却常常破坏肉制品。屠宰时，肠中生存的细菌泄漏出来并破坏肉类。同样，在奶制品中普遍存在的乳酸菌是牛奶和牛奶产品的主要破坏者。假单胞菌（*Pseudomonas*）在土壤和动物中常见，但也广泛参与新鲜食品的破坏。

表 29.2 新鲜食品[a]上的有害微生物

食品	微生物种类	一般的有害微生物,依属分类
水果和蔬菜	细菌	欧文氏菌属(*Erwinia*),假单胞菌属(*Pseudomonas*),棒杆菌属(*Corynebacterium*)(主要为蔬菜病原体,较少破坏水果)
	真菌	曲霉属(*Aspergillus*),灰霉属(*Botrytis*),地霉属(*Geotrichum*),根霉属(*Rhizopus*),青霉属(*Penicillium*),枝孢霉属(*Cladosporium*),链格孢属(*Alternaria*),疫霉属(*Phytophthora*),多种酵母(various yeasts)
新鲜肉、家禽和海产品	细菌	不动杆菌属(*Acinetobacter*),气单胞菌属(*Aeromonas*),假单胞菌属,微球菌属(*Micrococcus*),无色杆菌属(*Achromobacter*),黄杆菌属(*Flavobacterium*),变形菌属(*Proteus*),沙门氏菌属(*Salmonella*),埃希氏菌属(*Escherichia*),弯曲杆菌属(*Campylobacter*),李斯特氏菌属(*Listeria*)
	真菌	虫草属(*Clagosporium*),毛霉属(*Mucor*),根霉属,青霉属,地霉属,分枝孢菌属(*Sporotrichium*),假丝酵母属(*Candida*),色串孢属(*Torula*),赤色酵母属(*Rhodotorula*)
牛奶	细菌	链球菌属(*Streptococcus*),明串珠菌属(*Leuconostoc*),乳球菌属(*Lactococcus*),乳杆菌属(*Lactobacillus*),假单胞菌属,变形菌属
高糖食品	细菌	梭菌属(*Clostridium*),芽孢杆菌属(*Bacillus*),黄杆菌属
	真菌	酵母属(*Saccharomyces*),色串孢属,青霉属

a. 主要列举了新鲜、易变质食品的常见有害微生物,黑体为潜在的人类病原体。

微生物在食品中的生长遵循细菌生长的一般规律(见 6.4 节～6.6 节)。微生物生长的停滞后期(lag phase)依据其所生存的有机体和自身的生长程度不同而持续时间不同。微生物种群密度达到显著水平的时间取决于起始接种体的大小和对数期(exponential phase)的生长速率。对数期的生长速率取决于温度(temperature)、食品的营养值(nutrient value of the food)等其他生长条件。当微生物种群密度达到显著程度时才可观测到食品的变质现象。大多数微生物的对数生长期,种群密度很低以至于看不到任何现象发生,只在最末期由于种群的成倍增长才可观测到变质现象(见 6.6 节)。因此,微生物在食品中生长的多数时期内,并不能看到或轻易检测到食品的质量变化。

概念检查

食品的变质起因于污染微生物的生长。食品由于营养度和水含量的不同,对微生物生长的敏感性也不同。易变质和半易变质食品有保存期限制。许多微生物都可引起食品变质,一些破坏食品的微生物也是潜在的病原体。

◆ 列举依据食品中水活度的不同而对食品的主要分类。建议每种食品类型的储存条件。

◆ 鉴别至少三种可同时引起食品变质和人类疾病的细菌。

29.2 食品保存

我们调查了食品储藏和保存的过程。多数情况下,这些方法可延缓引起食品变质的微生物和食源性人类病原体的生长。但在其他一些情况下,保存方法被用于杀死所有的

微生物。

冷冻

除湿度之外，温度是影响微生物生长另一主要因素（见 6.10 节）。通常低储藏温度可导致微生物延缓生长和延长食品保存期。但是，耐冷（psychrotolerant）微生物（见 6.11 节）可在冷藏温度下生长。因此，在冷冻温度下，易变质食品可较长时间（多于几天）保存。但是冷冻和解冻改变了许多食品的物理结构，所以，对于多数新鲜食品来说，冷冻并不是可行的保存方法，但它已广泛用于肉类、多数水果和蔬菜的保存。-20℃是常用冷冻温度。在-20℃下，食品可保存数周或数月，但是冷冻物中含有液体水，仍然可能引起微生物的生长。若想长期保存，-80℃是必须的。但是维持如此低温费用昂贵，不能用于日常食品储藏。

腌制和酸度

影响食品中微生物生长的另一个主要因素是 pH 或酸度。食品的 pH 有差别但不大，多数是中性或酸性的。不同微生物在酸性条件下的生长能力也不同，但在低于 pH 5 条件下可抑制多数微生物的生长（见 6.13 节）。因此，酸常用于食品保存，该过程称为腌制（pickling）。弱酸——醋常被用于腌制过程（醋是乙酸菌的发酵产物）。除醋之外，腌制过程还需要添加大量的盐或糖以降低食品的可利用水和抑制微生物的生长。普通的腌制食品包括香瓜属（甜的、酸的和莳萝泡菜）、胡椒属、肉类、鱼和水果。

烘干和脱水

水活度（a_w）指微生物代谢过程中的可利用水。在纯净水中，a_w值为 1.00，分子松散，自由排列。增加溶质后，a_w值降低。水分子环绕溶质重排，结合了溶质的水分子需要能量打开与溶质的结合。微生物细胞必须与溶质竞争自由水。一般来说，细菌是竞争自由水的弱者，但真菌却有强的竞争能力。这意味着添加糖或盐等高浓度溶质可降低a_w值，抑制微生物的生长。例如，在 7.5%的 NaCl（a_w值 0.957）溶液中，除一些革兰氏阳性球菌［如葡萄球菌属（*Staphylococcus*）］外，几乎所有的细菌生长被抑制。此外，那些在低a_w条件下具有较强自由水竞争能力的微生物，通常在含糖等食品中生长较好。

许多重要的商业食品通过添加盐或糖保存。添加糖保存的食品主要是水果（果酱、果冻和蜜饯）。添加盐保存的食品主要为肉类和鱼。腊肠和火腿用各种加工过的盐保存，如 NaCl，有的还要经过熏制。不同产品的a_w值取决于添加盐的多少及烘干的程度。一些咸干肉，如乡村火腿可在室温下长期保存。一些有较高a_w值食品仍然需要冰箱进行长期保存。

通过烘干（drying）降低食品的可利用水，也能有效控制微生物的生长。牛奶、肉类、鱼、蔬菜、水果、鸡蛋和其他重要商业食品常用此种方法保存。最小程度破坏食品物理结构的烘干方法是冷冻干燥法（lyophilization，freeze-drying），通过该方法食品被冷冻，水分在真空下流失。但是该方法极其昂贵，主要用于特殊领域，比如在不利条件下储存的野战食品的制备。

加热

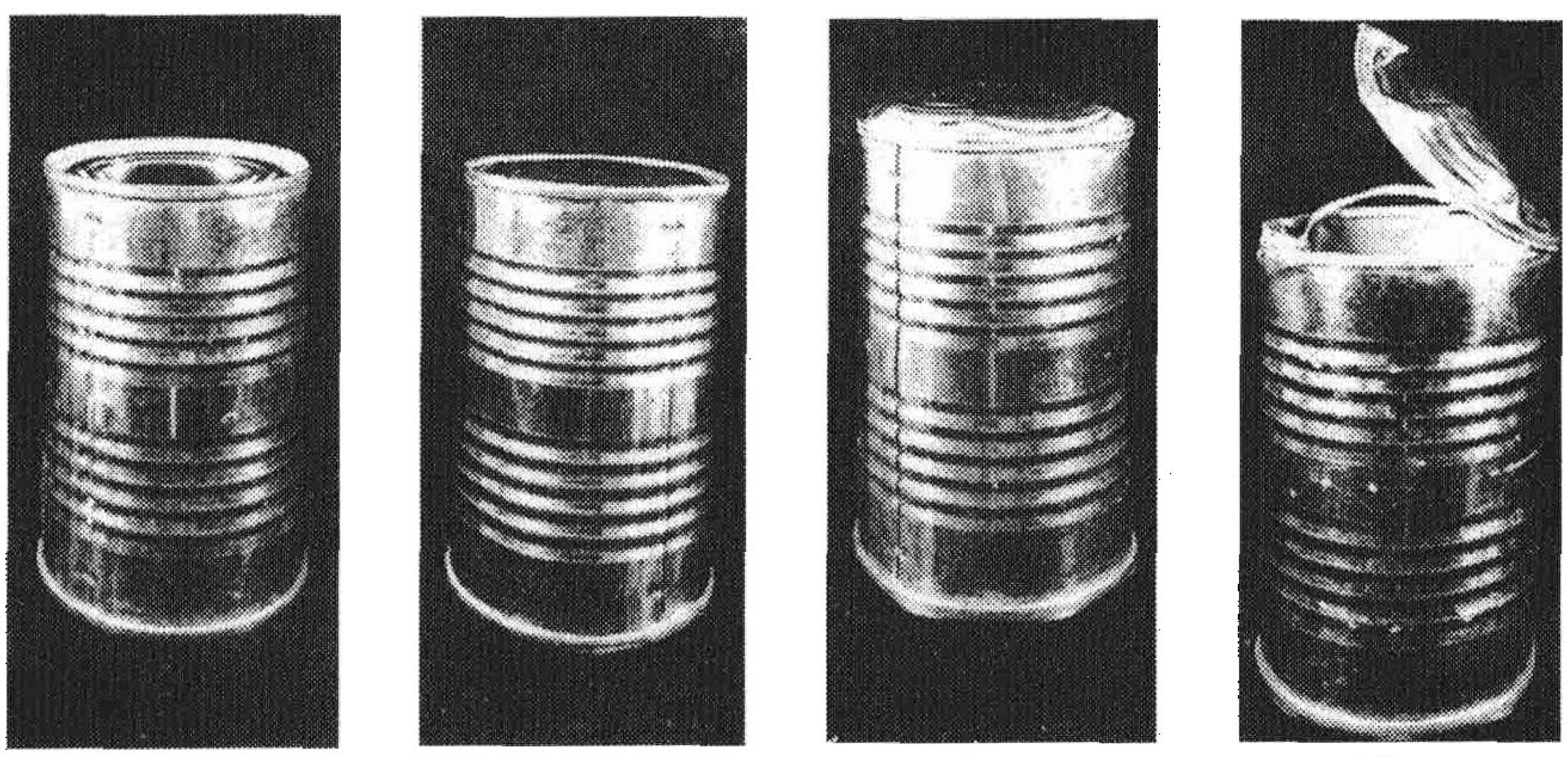
利用加热降低细菌数量或者消灭所有微生物的方法在液体和潮湿食品中被广泛运用。20.1 节介绍了巴斯德杀菌法（Pasteurization），即液体在特定温度下加热一定时间的方法。巴斯德杀菌法并不能对液体灭菌，但有效降低了细菌数量并显著延长了液体的保质期。

喷雾干燥法指牛奶等液体在热空气中雾化的过程。雾化过程降低了液滴的表面压，使食品在不被破坏的条件下迅速干燥。该方法已广泛应用于奶粉、特定浓度的液体奶制品、调味品等食品的加工过程中。

罐装（canning）指将食品密封在铁罐、玻璃瓶等容器中并加热的方法。该方法可杀死所有的活有机体，至少可确保残余有机体不能生长。当罐头被正确密封和加热后，即使储存在环境温度条件下，食品长期保存不变质。

罐头保存温度与时间的关系取决于食品的类型、pH、容器的大小、食品的密度和浓度。由于热度必须渗透到罐头中食品的内部，大的容器或密度大的食品加热时间必须足够长。酸性食品将其加热到 100℃即可达到杀菌的目的，但是非酸性食品必须加热到高压温度（121℃）。足够长时间的加热虽然可绝对保证每瓶罐头的灭菌（sterility）（如使用高压灭菌法，见 20.1 节），但是食品也发生了极大变化，它可能已不再美味，营养也流失。因此，正常的罐头食品可能并不是完全无菌的。

微生物在密封罐装食品中的生长会产生大量气体。气体使罐内的压强增加从而导致封口外凸，严重时可导致罐头爆炸（图 29.1）。罐头内的环境是缺氧的，在罐头食品中生存的一些梭菌属厌氧细菌（*Clostridium*）可产生毒素（见 12.20 节、21.10 节和 29.6 节）。因此，发生变化的罐头食品是不能食用的。此外，没有明显的气体产生的罐头也并不是绝对可安全食用的。



(a) (b) (c) (d)

图 29.1 被微生物破坏了的密封铁罐头的变化。(a) 正常罐头；由于罐头内部的负压（真空），罐头顶部轻微下凹。(b) 少量气体产生而引起膨胀。注意罐头顶部轻微上凸。(c) 大量气体产生而引起罐头严重膨胀。(d) 图为 (c) 所示的罐头压力达到最大，导致罐头爆炸，罐盖裂开。

化学防腐剂

约 3000 多种化学成分被用作食品添加剂。美国食品和药物管理部门将这些化学添加剂分类为“一般认为安全的”（generally recognized as safe，GRAS），并广泛应用于食品工业以增强或保持食品的质地、颜色、新鲜度或味道。一些添加剂可用于控制食品中微生物的生长（表 29.3）。丙酸钠（sodium propionate）等许多微生物抑制剂已使用数年，并没有发现对人类有毒害。其他的，如亚硝酸盐（nitrites，致癌物）、氧化乙烯（ethylene oxide）、氧化丙烯（propylene oxide）（诱导有机突变的物质），已有证据证实它们可能对人类健康有副作用，是受争议的食品添加剂。但是，添加剂的使用可显著延长食品的保质期。因此，化学食品添加剂对食品的数量的增加和质量保持具有重要作用。

表 29.3　化学食品防腐剂

化学成分	食品
丙酸钠或丙酸钾	面包
苯甲酸钠	碳酸饮料、水果、果汁、腌渍品、人造黄油、蜜饯
山梨醇酸	柑橘制品、奶酪、腌渍品、色拉
二氧化硫、亚硫酸盐、重亚硫酸盐	干果和蔬菜、酒
甲醛(来自食品的烟熏过程)	肉、鱼
乙烯和丙烯	调味品、干果、坚果
亚硝酸钠	熏火腿、熏肉

由于新的化学试剂被认可为防腐剂需要漫长的时间和昂贵的测试程序，因此，近期内（表 29.3）将不会出现可安全用作防腐剂的新的化学成分。

辐射

辐射（irradiation）指将食品电离辐射，这是目前降低细菌、真菌甚至昆虫污染的标准方法（20.2 节）。表 29.4 列举了可通过辐射处理的食品。调味品等食品常规辐射处理。目前在美国，汉堡、家禽等新鲜肉产品可以用辐射处理避免大肠杆菌 *Escherichia coli* O157∶H7 和其他肠病原体（汉堡）及空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）（家禽）等污染。食品辐射的 γ 射线由 ^{60}Co 或 ^{137}Cs 产生，或线性加速器产生高能量电子。食品吸收了一定量的辐射，由于食品的种类和使用目的不同，吸收的辐射量也有很大不同。例如，美国航空局宇宙飞行所用食品需要 44kGy，是汉堡包使用量 4.5kGy 的 10 倍（表 29.4）。在美国，使用辐射处理的食品必须在产品标签处注明（图 29.2）。



图 29.2　国际通用的辐射标志。经辐射处理的袋装食品必须使用该标志，同时还需注明辐射处理。

表 29.4 辐射食品的分类和使用目的[a]

食品分类	辐射目的
新鲜猪肉	控制马来丝虫寄生虫
新鲜水果和蔬菜	抑制生长和成熟
干调味品、药草、混合调味品	微生物消毒
未处理的冷冻肉制品和海鲜食品	控制食源性病原
国家航行和宇宙空间飞行使用袋装冷冻食品	灭菌
干燥或冻干酶制备	微生物消毒
冷冻、未加工家禽和家禽产品	控制食源性病源

a. 美国的销售标签法要求经辐射处理的食品必须有辐射标志（图 29.2），除按规定提供其他信息外，还需要特别说明该食品是经辐射处理的。

概念检查

针对食品加工和储存中微生物的破坏及可诱发疾病的微生物的生长提出了几种处理方法。食品营养度、可利用水、pH 的不同，对微生物生长的敏感度也不同。易变质食品中微生物生长可通过冷藏、冷冻、罐装、腌渍、冻干、化学添加剂或辐射控制。

◆ 列出至少四种食品保存方法。每种方法是如何控制微生物生长的?

◆ 鉴定既破坏食品又是病原体的微生物。

29.3 发酵食品

在此，我们将介绍通过微生物作用保存、加工食品或提高食品品质。许多食品和饮料是通过微生物来制造的。微生物加工可使原材料发生巨大改变，经微生物加工的产品称为发酵食品（fermented food）。发酵（fermentation）是指碳水化合物等有机成分在缺少外部电子受体情况下的厌氧代谢（见 5.9 节和 5.10 节）。参与食品发酵的微生物有乳酸菌（见 12.19 节）、乙酸菌（见 12.8 节）和丙酸菌（见 12.22 节）（表 29.5）。这些细菌不能在 pH 4 之下的环境生长，所以食品发酵是一个自我限制的过程。

表 29.5 发酵食品和初始发酵微生物[a]

食品分类	初始发酵微生物
奶制品	
奶酪	乳球菌(*Lactococcus*)
	乳杆菌(*Lactobacillus*)
	嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilius*)
发酵奶制品	
乳酪	乳球菌
酸奶油	乳球菌

续表

食品分类	初始发酵微生物
酸奶酪	乳杆菌
	嗜热链球菌
酒精饮料	发酵单胞菌属(*Zymomonas*)
	酵母菌[b](*Saccharomyces*)
发酵面包	酿酒酵母[c](*Saccharomyces cerevisiae*)
肉制品	
干香肠(意大利辣香肠、意大利腊肠)	片球菌(*Pediococcus*)
和半干香肠(夏天香肠、波罗尼亚香肠)	乳杆菌
	微球菌(*Micrococcus*)
	葡萄球菌(*Staphylococcus*)
蔬菜	
甘蓝(德国泡菜)	明串珠菌(*Leuconostoc*)
	乳杆菌
黄瓜(腌菜)	产乳酸细菌(Lactic acid bacteria)
酱油调料	曲霉(*Aspergillus*)
	嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)
	酵母(yeast)

a. 除特殊注明外，均为乳酸菌属（见 12.19 节）。发酵单胞菌属涉及假单胞菌属（见 12.7 节）。

b. 酵母（见 30.13 节）。许多酵母菌种被用于酒精发酵。

c. 面包酵母。

发酵面包是最普通的发酵食品之一，在发酵过程中酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）（表 29.5）将糖和面粉碳水化合物转变为二氧化碳，使面包膨胀，并在面包上产生小洞（图 29.3）。在第 30 节将会介绍白酒、啤酒、威士忌等发酵饮料产品，和工业中大规模应用微生物的加工过程（见第 5 章）。

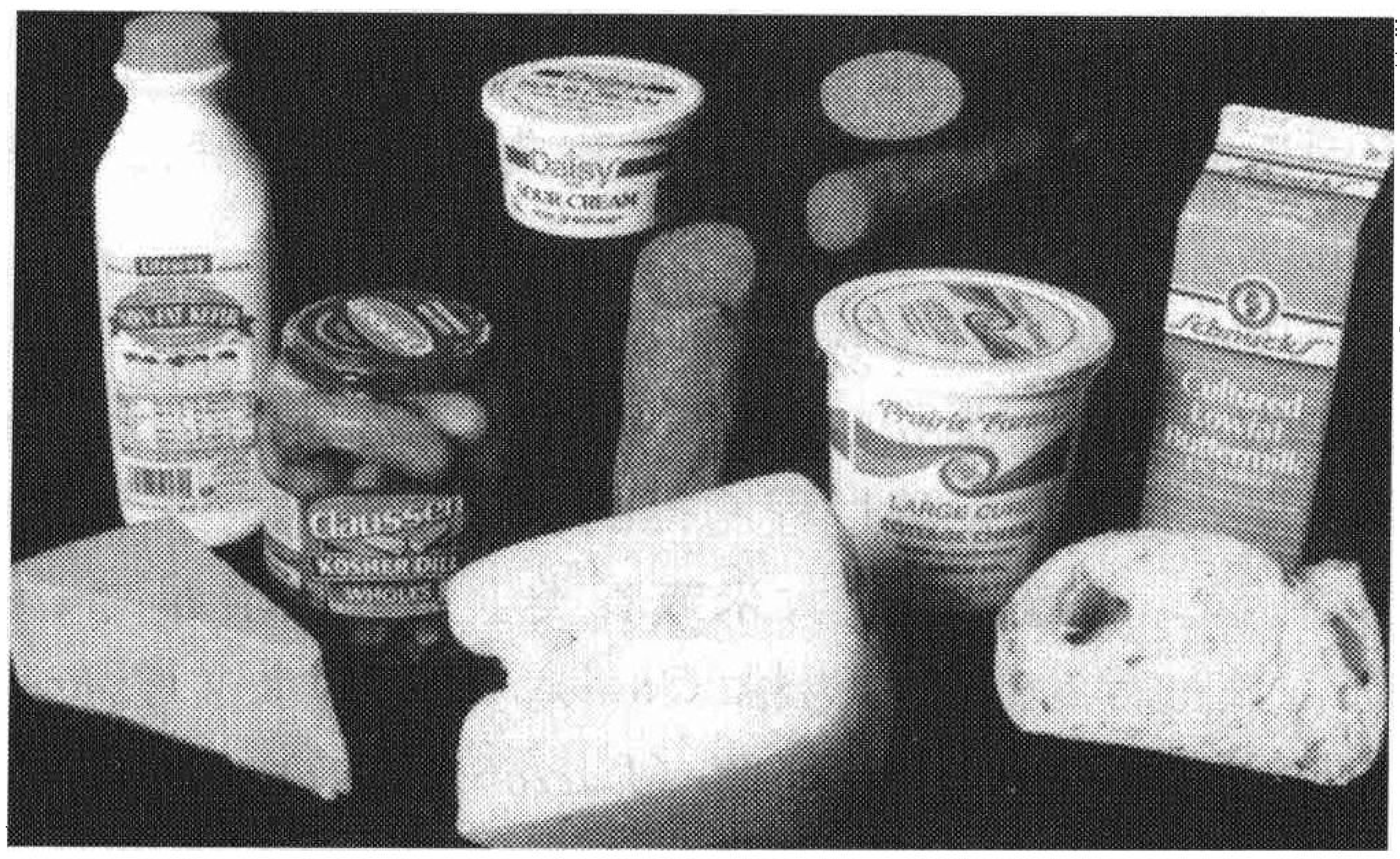


图 29.3　发酵食品。面包、香肠肉、奶酪、其他奶制品、蔬菜等食品均是由微生物发酵作用催化产生的。

奶制品

牛奶是一种易腐败的重要经济食品（见 29.2 节），奶制品的发酵最初是为了保存牛奶。奶制品包括奶酪和其他酸奶酪、乳酪、酸奶油等发酵奶制品（图 29.3）。牛奶含有乳糖（lactose），乳糖被乳糖酶（lactase）水解为葡萄糖和半乳糖，这些单糖经发酵最终成为乳酸（图 5.14）。发酵使食品由 pH 中性显著降低，奶酪 pH 低于 5.3，其他发酵奶制品 pH 低于 4.6。微生物完成发酵过程需要大量的乳酸菌，产生的乳酸为主要的最终发酵产物（见 12.19 节）（表 29.5）。

生牛奶中的各种乳酸菌发酵剂及发酵过程所经历时间取决于产品的需要（表 29.5）。一些奶酪，需要二次接种以产生其他发酵物。例如，瑞士型奶酪需要接种丙酸杆菌（*Propionibacterium*）。第二次发酵分解代谢乳酸为丙酸、乙酸和 CO_2（见 12.22 节，图 12.68）。二氧化碳所产生的洞是瑞士奶酪的独有特征。二次接种乳杆菌（*Lactobacillus*）和娄地青霉（*Penicillium roqueforti*）使蓝色乳酪产生蓝色纹理、独特口感和芳香气味。每种奶酪都需要精确控制条件，发酵时间、温度、成熟程度和发酵微生物类型都需要严格控制，以确保生产出独特的、可食用的产品。

肉制品

肉制品可分为几类。香肠（sausage）一般是由猪肉或牛肉制成的，极少数是用家禽肉制得。最普通的是干香肠，如意大利腊肠和意大利香腊肠。半干香肠有波罗尼亚香肠和夏天香肠（图 29.3）。

香肠是用肉、盐和调味品的混合物制成的。加入初始乳酸菌，发酵使香肠的 pH 降低至 5 以下。发酵后，香肠常需要烟熏和烘干。干香肠的水含量约 30%。经最终加工后，干香肠可在室温下保存较长时间。半干香肠的最终水含量为 50%，对微生物破坏抵抗力弱，需保存冰箱中。

鱼混合大米、小虾后发酵可制成各种鱼酱和鱼风味食品。

蔬菜和蔬菜制品

许多蔬菜制品是通过发酵制成的。发酵蔬菜产品的种类多种多样。经济上最重要的发酵蔬菜制品有德国泡菜（甘蓝发酵）和一些腌菜（黄瓜发酵）。橄榄、洋葱、土豆、胡椒和各种水果都可以发酵。

蔬菜常常浸泡在盐水中发酵以助保存和增香。发酵可破坏植物的组织从而促进消化。例如，发酵豆制品（豌豆、菜豆、扁豆）能有效降低新鲜豆子引起的胃胀气。

豆酱是大豆和小麦经过复杂发酵过程制得的，是煮熟的大豆与曲霉（*Aspergillus*）产生的酶混合（表 29.5）。曲霉一般在大米或谷类上培养。培养物平铺在小麦-豆混合物上，生长 2～3 天。该过程的制品称为粬（koji）。粬与盐水（17%～19% NaCl）混合发酵 2～4 个月甚至更长时间。接种乳杆菌（*Lactobacillus*）和片球菌（*Pediococcus*）、酵母菌等各种微生物，产生发酵产品，并制得人们所需要的最终产品。发酵之后，液体酱沉淀、过滤、灭菌（见 20.1 节），装瓶制成豆酱。

概念检查

微生物发酵是许多食品保存和生产的一个重要过程，这些食品包括面包、奶制品、肉和蔬菜。

- 确定有哪些微生物发酵或增强奶、肉、蔬菜制品。
- 确定哪些微生物种群在食品发酵中很重要。

Ⅱ 微生物采样与食物中毒

对食物的净化不够或保存不当，可能会使病源微生物得以生长，从而导致很高的致病率和死亡率。由食物传染的疾病与由饮水传染的疾病一样，都是常见的疾病来源。一个遭到污染的食物源（如食物加工厂或饭店）就可能会影响大量的人群。每年美国有报道的由食物导致的疾病暴发就有 25 000 例，这些暴发据估计可导致约 1300 万例疾病。有报道的这些疾病由于大多为发生在家庭中的个案，故只影响少数的个体。这些疾病的暴发经常是由于消费者对食物处理或制备不当而造成的。事实上，由于难以确定食物与其引起的疾病间的关系，大多数由饮食传播的疾病暴发和传染病都未予以报道。

29.4 由食物传染的疾病与微生物采样

表 29.6 总结了在美国最常见的由食物介导的传染病及其致病微生物。这些常见的疾病可以分为两类，食物中毒（food poisoning）和食物传染（food infection）。要分离与这些疾病相关的微生物需要借助于专门的微生物采样技术。

表 29.6　美国年度食物传染疾病评估[a]

致病生物	疾病类型[b]	病例数/年	相关食物
细菌			
蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)	FP 和 FI	27 000	大米及淀粉类食物，高糖食物，肉，肉汤，布丁，奶粉
空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)	FI	1 963 000	家禽，奶制品
产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)	FP 和 FI	248 000	烹煮并再加热的肉及肉制品
大肠杆菌 O157∶H7 株(*Escherichia coli* O157∶H7)	FI	63 000	肉，尤其是绞碎肉
其他致肠病大肠杆菌	FI	110 000	肉，尤其是绞碎肉
单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)	FI	2 500	肉及乳制品
沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)	FI	1 340 000	家禽，肉，乳制品，蛋类
金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)	FP	185 000	肉，甜点
链球菌属(*Streptococcus* spp.)	FI	50 000	乳制品，肉
小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)	FI	87 000	猪肉，牛奶
其他所有细菌	FP 和 FI	102 000	

续表

致病生物	疾病类型[b]	病例数/年	相关食物
所有细菌		**4 177 500**	
原生动物			
微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)	FI	30 000	生肉或加热不足的肉
圆孢球虫(*Cyclospora cayetanensis*)	FI	16 000	新鲜食物
吸吮贾第虫(*Giardia lamblia*)	FI	200 000	被污染或感染的肉
刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)	FI	113 000	生肉或加热不足的肉
所有原生动物		**359 000**	
病毒			
类诺沃克病毒(Norwalk-like virus)	FI	9 200 000	贝类,其他许多食物
其他所有病毒	Fi	82 000	
所有病毒		**9 282 000**	
每年食物传染疾病总数		**13 818 500**	

a. 评估主要根据由美国佐治亚州亚特兰大市疾病控防中心提供的数据，仅代表近几年的特点。

b. FP，食物中毒；FI，食物传染。

食物传染的疾病

食物中毒（food poisoning，food intoxication）是指由于摄入已经含有微生物毒素的食物而导致的疾病。生成这些毒素的微生物并不必须在宿主体内生存，并且这些微生物往往在被污染的食物被摄入时已不再存活。这些疾病是由预先形成的微生物毒素的摄入及其后随效应引起的。在前面的章节中我们已经讲到过这类毒素，值得一提的如肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）的外毒素（见 21.10 节）及金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的超抗原（见 22.16 节）。食物传染（food infection）是指由于摄入含有致病菌的食物而导致的感染。在本书的 29.7 节～29.9 节会分别对几种主要的由食物导致的感染进行介绍。

食物传染疾病的微生物采样方法

如 29.1 节中所讲，即使新鲜的食物中，微生物也非常常见。由于致病菌可能会与许多无害的菌体混在一起，一些基于非培养的方法已经被开发出来，以检测那些重要的致病菌如大肠杆菌（*Escherichia coli*）O157：H7 菌株、沙门氏菌（*Salmonella*）、葡萄球菌（*Staphylococcus*）及肉毒梭菌等。已经有相当数量的基于分子生物学、免疫学的方法被应用于食物和其他商品如药物和化妆品中毒素和致病菌的检测。在 24.12 节中，我们介绍了利用核酸探针和 PCR 来检测包括食物传染的疾病在内的特定致病菌。

但通常情况下，即使食物中带有特定的致病菌或者毒素，也不足以将该食物或致病菌与特定的由食物传染的疾病暴发联系在一起。想要完成对特定疾病暴发的检测，最好可以将致病生物分离出来并将其直接鉴定出来。从非液体食物中分离培养致病菌往往需

要预处理，以将包埋在食物中的微生物悬浮起来。最合适的方法是利用一种叫做 stomacher 的专用搅拌器，它可以利用桨片通过挤压将食物样品快速匀浆。食物在采样后要尽快进行检测。如果不能在采样后 1h 内开始检测，则最好将食物冻存起来。解冻的食物时应该在对其冷冻的原始容器中进行，且在解冻后要尽快进行检测或培养。但是要确立致病菌和疾病的因果联系，除了要在食物中分离获取致病因子外，从患者体内分离到由食物传染的致病菌也是必需的。很多情况下，可以通过对排泄物样品进行培养以获得供检测的致病菌（见 24.1 节）。

与对人体致病菌所讲的一样，可以首先将食物或患者的样品接种在加富培养基上富集，然后再转接到选择培养基中进行分离和鉴定（见 24.2 节）。通过菌的生长特性以及 PCR、核酸探针、核酸序列分析等遗传指纹技术和其他分子鉴定技术，也可以对由食物传染的致病菌做出最终鉴定，这对于将特定微生物与由食物传染的疾病或个体疾病联系起来可能是必须的。

概念检查

由食物传染的疾病包括食物中毒和食物传染。食物中毒是由微生物毒素引起的，而食物传染则是由于微生物在人体内生长引起的。可以利用一些专业技术来从食物中对微生物采样。

- 如何区别食物传染和食物中毒?
- 描述一下对固体食物（如肉）中存在的微生物的采样。
- 哪些技术被用来鉴定由食物传染的疾病?

29.5 葡萄球菌食物中毒

最常见的一种食物中毒是由金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）引起的。该细菌及其同属中的其他几个成员是一类小的革兰氏阳性球菌（图 29.4，见 12.19 节）。与 26.9 节中讲的一样，葡萄球菌在几乎所有人的皮肤和呼吸道上都有分布且通常是一些机会致病菌。金黄色葡萄球菌之所以能够频繁地导致食物中毒是因为它们可以在许多常见的食物中生长，并产生一些热稳定的蛋白质-超抗原外毒素（见 22.16 节）。人一旦摄入被其污染过的食品，在 1～6h 内就会引发以恶心、呕吐和腹泻为主要症状的肠胃炎。

流行病学

美国每年有 185 000 例葡萄球菌食物中毒（表 29.6）。常引起金黄色葡萄球菌食物中毒的食物包括蛋奶沙司、含有乳汁的烘烤食物、家禽、猪肉及猪肉产品、肉汁、鸡蛋、肉沙拉、布丁和奶油色拉调料等。如果这些食物在做好后保存在冰箱里，它们会比较安全，因为低温下金黄色葡萄球菌生长显著被抑制；但我们通常不将其保存在冰箱中，而是放于厨房的室温下或者在野餐时食用。如果这些食物在制作过程中从被污染的食物加工点处引入了金黄色葡萄球菌，细菌会在上面快速地生长并产生外毒素。由于这

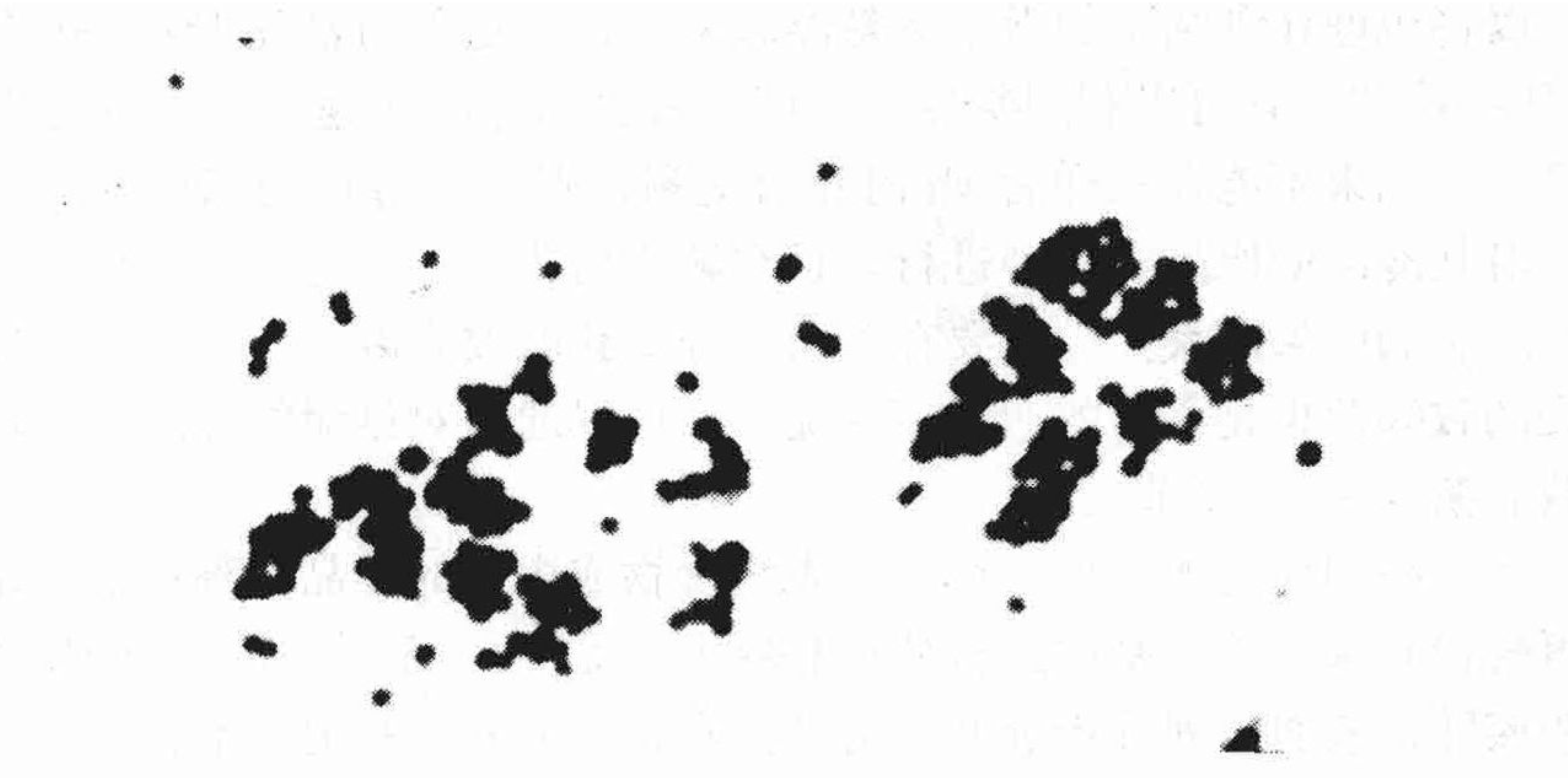


图 29.4 金黄色葡萄球菌。在革兰氏染色中，每个革兰氏染色呈阳性的球菌直径约为 0.8μm。葡萄球菌可以在不同的轴向上分裂，从而产生典型的葡萄串状细胞群。

些毒素相对来说是热稳定的，因此即使这些含有毒素的食物在食用之前进行再加热，毒素可能依然保持其毒性。由于预先形成的毒素已经足以致病，食物中不需要有活的金黄色葡萄球菌存在就可以导致发病。

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）菌株可以产生 7 种不同但相关的外毒素。大多数金黄色葡萄球菌的菌株仅可以产生这些外毒素中的一种或两种，一些甚至不能产生外毒素。但是，这些毒素中的任何一种都足以导致葡萄球菌食物中毒。这些外毒素被进一步归入超抗原（superantigen）一类。超抗原通过激活大量的 T 淋巴细胞来发挥作用，被激活的 T 淋巴细胞又可以释放一类称作细胞因子的胞内调节子，从而在肠道中引发炎症反应，导致肠胃炎的发生并带来体液在肠道的大量流失（见 22.16 节）。

金黄色葡萄球菌产生的毒素中最常见的是外毒素 A，它是由细菌基因组上的基因编码的一个短肽。尽管 *entA* 基因位于细菌的染色体上，而 B 型和 C 型金黄色葡萄球菌外毒素可能是由质粒、转座子或溶原态的细菌噬菌体编码，对基因 *entA* 以及其他金黄色葡萄球菌毒素基因的克隆和序列分析表明，这些毒素基因间存在遗传相关性。我们在 21.10 节和 21.11 节中已经介绍了附加遗传因子（如质粒和细菌噬菌体）作为毒素产生载体的重要性。

诊断、治疗和预防

目前已经有基于对外毒素（外毒素的 ELISA 检测；见 24.10 节）或者 DNA 外切酶（一种降解 DNA 的酶）检测的技术来检出食物中的金黄色葡萄球菌。但这些快速检测方法只是定性检测，仅能在其检测灵敏度范围内确定金黄色葡萄球菌产物的存在与否；而且基于 DNA 外切酶的检测并不能表明外毒素的存在，因而不能准确地预测食物中毒。要对数据进行定量并确定细菌污染的程度，需要进行细菌的平板计数。葡萄球菌的平板计数需要利用高盐培养基（终浓度为 7.5%的氯化钠或氯化锂）。与食物中其他大多数的细菌相比，葡萄球菌可以在高盐和低水的条件下旺盛地生长（见 29.1 节）。

金黄色葡萄球菌食物中毒可以很严重，但是却可以自愈，通常会在发作 48h 后停止。病情较为严重的可能需要对其脱水症状进行治疗。由于金黄色葡萄球菌食物中毒不

是由活菌感染引起，而是由预先形成的毒素造成的，故用抗生素对其治疗是无效的。

在食物生产和准备过程中采用严格的卫生措施和标准，并对食物进行低温储藏以抑制细菌生长可以有效地预防金黄色葡萄球菌食物中毒。易于为金黄色葡萄球菌居存的食物如果在 4℃放置几个小时以上，则不宜食用，最好将其丢弃。

概念检查

金黄色葡萄球菌食物中毒是由于摄入了预先形成的外毒素引起的，这是由食物中生长的金黄色葡萄球菌产生的一种超抗原。很多情况下，并不能从被污染的食物中分离培养到金黄色葡萄球菌。

◆ 了解金黄色葡萄球菌食物中毒的症状并解释葡萄球菌外毒素的活性。

◆ 抗生素是否会影响葡萄球菌食物中毒的结果和严重程度？请解释原因。

29.6 梭菌食物中毒

产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）和肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）都可以导致严重的食物中毒。梭菌属的成员都可以产生厌氧芽孢（见 12.20 节）。罐头生产和烹调过程可以杀死活体生物，但不能杀死芽孢；在合适的厌氧环境中，芽孢就会出芽并产生毒素。

产气荚膜梭菌食物中毒

产气荚膜梭菌是土壤中常见的棒状、产芽孢的厌氧革兰氏阳性菌（图 29.5）。它也在人或动物的肠道中少量存在，因而可以在排泄污水中见到（见 12.20 节）。产气荚膜梭菌是美国食物中毒（food poisoning）报道中最常见的病因，估计每年约有 248 000 例产气荚膜梭菌食物中毒（图 29.6）。



图 29.5　产气荚膜梭菌的革兰氏染色。每个革兰氏染色呈阳性的小棒直径约为 1μm。

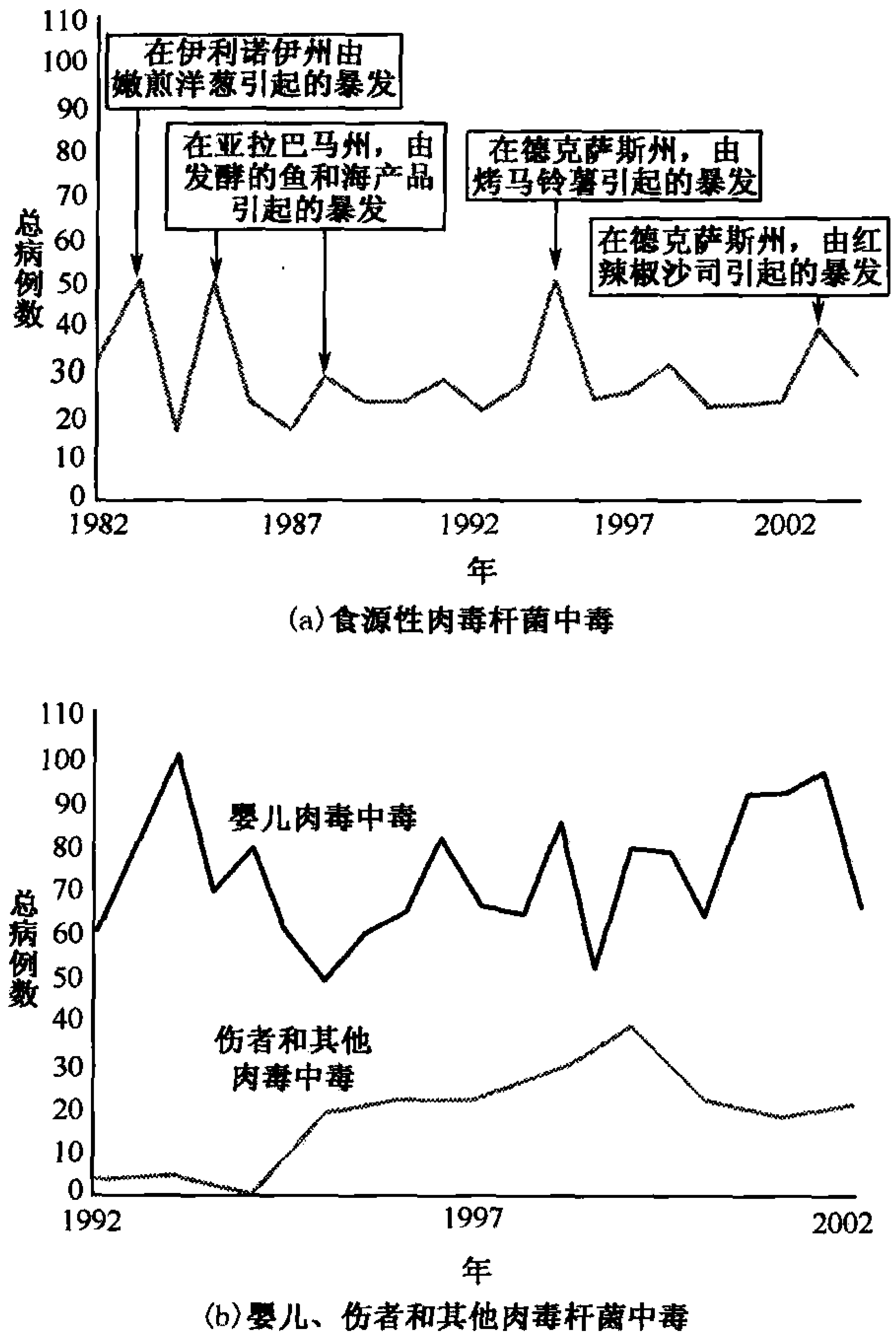


图 29.6 肉毒中毒在美国的发病频率。(a) 由食物传染的肉毒中毒。在病例数较多的年份，图中已标出导致其数目增加的疾病暴发。(b) 包括婴儿肉毒中毒在内的其他肉毒中毒类型。美国一多半的婴儿肉毒中毒病例发生在加利福尼亚。伤口肉毒中毒和其他肉毒中毒包括了所有其他的疾病来源。数据由美国佐治亚州亚特兰大市疾病控制与预防中心提供。

这种疾病是由于摄入大量（$>10^8$个细胞）的产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）引起的，常与食用被污染的加工/未加工食品（尤其是肉类、禽类和鱼类）有关。大批量烹制的肉食（这种情况下热透过较慢且加热常常不足）在 20～40℃放置一段时间后，就会有产气荚膜梭菌大量生长。产气荚膜梭菌的芽孢可以在厌氧的条件下（例如封闭的容器内）发芽，并在肉中快速生长。但是，此时还不会出现毒素。

如果食用了这些被污染的肉，产气荚膜梭菌就开始在肠道中形成芽孢，并产生产气荚膜梭菌外毒素（表 21.4）。这种外毒素可以改变肠道上皮的通透性，导致腹泻和肠道痉挛，但是不会导致发烧或呕吐。一般在食用污染食物后 7～15h 开始出现产气荚膜梭菌食物中毒症状，但是症状会在 24h 内消失，很少出现致死情况。

诊断、治疗和预防

通常可以通过从肠道中分离产气荚膜梭菌来诊断产气荚膜梭菌食物中毒，而更准确

的诊断方法则是利用酶联免疫吸附技术从粪便中直接检测产气荚膜梭菌外毒素（见 24.10 节）。虽然已经开发出了其外毒素的抗毒素，但由于产气荚膜梭菌食物中毒可以自愈，故通常并不需要对其治疗。产气荚膜梭菌食物中毒的预防需要采取措施以防止对食物及其原材料的污染，并需要控制食物的加工和包装过程以保证所有的食物都得到充分加热。烹制好的食物要尽快降温冷冻以抑制产气荚膜梭菌的生长。

肉毒中毒

肉毒中毒是最严重的食物中毒，它通常是可以致命的。肉毒中毒发生在摄入含有由杆状、厌氧的革兰氏阳性菌——肉毒梭菌（*Clostridium botulinum*）产生的外毒素的食物后。这种微生物通常生活在水或土壤中，但是其芽孢却可以污染收获或屠宰之前的食物。如果这些食物可以被适当处理以杀死或去掉肉毒梭菌的芽孢，也不会出现什么问题；一旦有芽孢生存下来，它们就可能开始生长并产生毒素。即使随之仅产生少量的神经毒素，其毒性也很强。

我们已经在 21.1 节中讲述了肉毒毒素的性质和活性（图 21.20）。肉毒毒素是一种神经毒剂，它可以导致疲软性瘫痪，该毒素可影响控制诸如呼吸、心跳等功能的自主神经系统。迄今已知的肉毒毒素至少有 7 种不同类型。这种毒素可以被高温破坏（80℃，10min），因此即使被毒素污染过的食物，经过彻底加热后基本上也是无害的。

大多数的肉毒中毒都是由于食用处理后未经烹调的食物（图 29.6a）。例如，在准备冷甜点时用到的家庭自制罐装蔬菜（不是酸菜，如罐装玉米或豌豆等）通常都不再加热而直接使用。这种情况下，肉毒梭菌芽孢就可以出芽生长成细菌细胞进而产生肉毒毒素。一旦吃下这些食物，即使是少量的，也会导致这种严重的食物中毒。

肉毒梭菌的芽孢被婴儿摄入后会导致婴儿肉毒中毒——有时候芽孢是混在生蜂蜜中被摄入的，但是大多数情况下其来源是不清楚的（图 29.6b）。如果婴儿的正常菌群发育不完全或正在接受抗生素治疗，那么孢子就有可能在婴儿的肠道萌发，肉毒梭菌细胞就有可能生长并释放毒素。大多数婴儿肉毒中毒发生在出生后一周至两个月内；6 个月以上的孩子由于肠道正常菌群发育相对完全，则很少患这种病（见 21.4 节）。在美国约 70%的肉毒中毒病例为婴儿肉毒中毒。伤口处的肉毒中毒也偶尔发生，这可能是由于经非肠道途径引入了肉毒梭菌芽孢所致；伤口处的肉毒中毒通常与非法毒品注射相关（图 29.6b）。

所有形式的肉毒中毒发生的概率都很低，近年来，美国每 1000 万人中每年平均约有 6 个人中毒。在过去的 10 年中，平均每年肉毒中毒的病例在 155 例左右，但是 25%的患者都死于该疾病。肉毒中毒之所以能够致死是因为肉毒神经毒剂可以导致呼吸瘫痪和心跳停滞（见 21.1 节）。

诊断、治疗与预防

肉毒中毒的诊断一般通过证明在患者血清中存在肉毒毒素或可以在食品中发现肉毒梭菌或毒素。通常将实验证据与临床观察结果（包括在摄入被污染的食物 18～24h 后出现的神经学方面的标志——视力受损、口齿不清等局部瘫痪现象）结合起来以诊断肉毒中毒。对该病的治疗主要依靠早期确诊和使用抗毒素（见 22.13 节）及针对呼吸瘫痪的

机械通气（见 21.1 节）。肉毒中毒的预防要求保持对食物包装、保存方法的严格控制。可以通过对敏感食物加热以杀死芽孢或煮沸 20min 以灭活毒素达到预防肉毒中毒的效果。家庭自制的食物是肉毒中毒暴发最常见的起因。

婴儿肉毒中毒案例中，经常在肠道内容物中发现肉毒梭菌和毒素。婴儿肉毒中毒通常可以自愈，大部分婴儿可以靠辅助治疗（如辅助呼吸）康复，偶尔会有因为呼吸停止而导致死亡的案例。蜂蜜可能是肉毒梭菌芽孢的一个来源，故不推荐给 2 岁以下的孩子喂食蜂蜜。

概念检查

梭菌食物中毒是由于摄入由食物中微生物产生的毒素或微生物在体内的生长及产生毒素所致。产气荚膜梭菌食物中毒是一种常见且可以自愈的肠道疾病；而肉毒中毒则是少见但严重的疾病，患者通常会有很高的死亡率。

◆ 简述可能会导致产气荚膜梭菌食物中毒的原因，这种食物中毒的最可能后果是什么？

◆ 简述可能导致肉毒中毒的原因，肉毒中毒可能的后果是什么？

◆ 为什么婴儿肉毒中毒要比其他的肉毒中毒常见？

Ⅲ 食物传染

食物传染（food infection）是由于摄入被致病菌污染的食物而导致的活性感染。食物可能含有足够数量的致病菌而导致感染并使宿主患病。食物传染是一种常见的由食物传染的疾病（表 29.6），本部分从一种典型而常见的食物传染——沙门氏菌（*Salmonella*）食物传染讲起。许多食物传染因子同时也是由水传播的疾病的病因（第 28 章）。

29.7 沙门氏菌病

沙门氏菌病（salmonellosis）虽然有时被称为食物中毒，但是实际上是一种由食物导致感染引起的肠胃疾病，因为该病只有当致病菌在肠道中生长后才出现症状。

沙门氏菌（*Salmonella*）是一类与大肠杆菌（*Escherichia coli*）、志贺氏菌（*Shigella*）以及其他肠道细菌相关的杆状的兼性厌氧的革兰氏阴性菌（见 12.11 节）。沙门氏菌一般生长于动物的肠道中，因而在污水可中分离到。事实上所有的沙门氏菌都是人类致病菌。例如，伤寒沙门氏菌就可以使人罹患严重的伤寒热，但这种病在美国很少见，500 多例由食物传染的病例中大部分都是由国外传播进来的。然而沙门氏菌属中其他菌种却可以导致由食物传染的肠胃炎。已知沙门氏菌属中总共约有 2000 种血清型或变种，都可以导致人类疾病。鼠伤寒沙门氏菌（*S. typhimurium*）是最常见的导致沙门氏菌病的因子。

流行病学

过去的十年中报道的沙门氏菌病例一直稳定保持在每年 40 000～45 000 例（图 29.7）。但是被报道的沙门氏菌病例可能仅占所有病例的 4%，事实上每年病例估计会超过 130 万（表 29.6）。

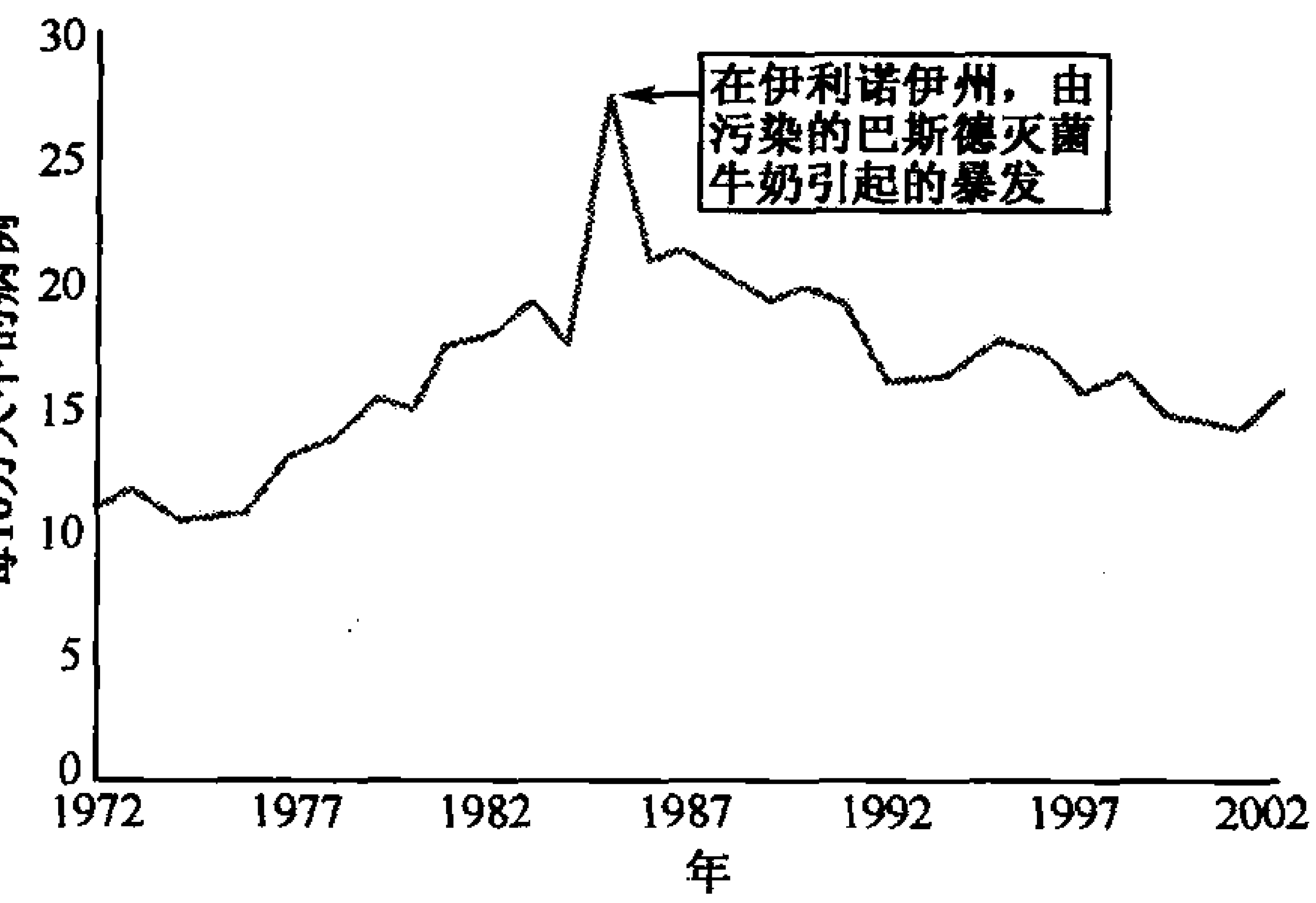


图 29.7 1972～2002 年间美国沙门氏菌病的流行程度。数据表示单位为每 10 万个体中的病例数。2002 年一共报道了 44 264 个病例。流行病学分析表明，仅有 3%的沙门氏菌病得以正确诊断和报道，这就意味着实际每年约有 130 万例沙门氏菌病。1984 年的高发病率是由于一个大的牛奶场的巴氏消毒奶被未经加工的牛奶污染，从而导致几千例疾病的增加。大约 95%的病例是由于食物传染的。数据由美国佐治亚州亚特兰大市疾病控制与预防中心提供。

沙门氏菌病来自人类和其他温血动物的肠道，有若干途径可能将这些致病菌引入食物当中。这些病菌可能通过食物加工者的粪便污染进入食物。食物生产动物如鸡、家畜等可能也携带有对人类致病的沙门氏菌，并可能会将这种细菌带入鸡蛋、肉及奶制品等新鲜食品。沙门氏菌感染病经常被发现来自以未烹煮过的鸡蛋为原料制作的食物，如奶油蛋羹、奶油蛋糕、蛋白甜饼、馅饼、蛋奶酒等。其他一些常与沙门氏菌病暴发相关的食物是肉和肉制品，如肉馅饼、未烹煮过的腌肠和肉、禽类，以及牛奶和乳制品。

最常见的沙门氏菌病是由沙门氏菌引起的小肠结肠炎（enterocolitis）。人体摄入残存有活体沙门氏菌的食物后，就会有菌体在小肠和大肠中定植，一般在摄入食物 8～48h 后症状开始发作。发病的症状包括突发性的头痛、打冷战、呕吐和痢疾，以及随后持续数天的发烧。这种疾病通常会在 2～3 天后自愈，但即使已经恢复的患者依然会在之后的几星期内从粪便中排出沙门氏菌。一些患者可能已经康复且不表现出症状，但却在几个月甚至几年内持续排泄出致病菌，导致长期带菌状态（见 25.3 节）。

沙门氏菌病可能还会导致败血症（一种血液感染）以及肠热症或伤寒热（typhoid fever)，伤寒热的典型病症是全身性感染以及持续数星期的高烧。伤寒热如不加治疗，死亡率可达 15%。

诊断、治疗与预防

沙门氏菌病一般可以通过观察临床症状、近期饮食状况以及培养粪便中微生物诊断。由于动物来源食品中的沙门氏菌是常见的食物污染源，目前已经有数种常规的针对

沙门氏菌的选择性培养基（见 24.2 节）以及检测方法来监测动物性食品，如生肉、家禽、蛋类、奶粉等的生产。

对于小肠结肠炎通常不需要治疗，抗生素治疗也不会缩短疾病的周期或携菌时间，但是对败血症和伤寒热的抗生素治疗却可以有效地缩短疾病周期并降低其严重性。适当的抗生素治疗可以使伤寒热的死亡率降到 1%以下。一些沙门氏菌属菌株对多种抗生素药物均有抗性。

对于被食品加工者污染的熟食或罐装食品，如果未经加热或冷藏而长期存放，沙门氏菌就会在其中生长。熟食在 70℃下加热 10min 以上后如果立即食用，或在 50℃保温，或在低于 10℃下储存，基本上被认为是安全的。可能正是因为夏季的温暖环境有利于食物中微生物的生长，沙门氏菌感染在夏季要比在冬季更为常见（图 29.4）。

尽管各地区的法律和管理条例不同，但由于沙门氏菌病的携菌时间较长，在连续三次粪便排出物沙门氏菌检测结果阴性前，被感染的个体通常都会被禁止从事食品加工活动。

概念检查

美国每年有超过 130 万例的沙门氏菌病。这些疾病都是由于被摄入的沙门氏菌感染引起的。这些沙门氏菌均是由生产食品的动物或食品加工者将其混入食物链的。

◆ 描述一下沙门氏菌病食物传染的概况。它与食物中毒有何不同?

◆ 如何控制沙门氏菌对食物生产动物的污染?

29.8 致病性大肠杆菌

大多数大肠杆菌（*Escherichia coli*）并不致病，是人类肠道中常见的共生菌。但是，大肠杆菌的一些菌株却是人类潜在的致病菌。所有致病的菌株都作用于肠道，一些菌株还具有产生肠毒素的特点（见 21.11 节）。这类短棒状的革兰氏阴性菌属于肠杆菌科（见 12.11 节）。目前已知约有 200 株大肠杆菌致病性菌株可导致致命的痢疾及尿道感染。根据其产生的毒素及导致疾病的不同，可将大肠杆菌致病株分为几类。

肠出血性大肠杆菌（EHEC）

肠出血性大肠杆菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*，EHEC）可以产生 vero 细胞毒素（verotoxin），这是一种与痢疾志贺氏菌（*Shigella dysenteriae*）产生的志贺毒素类似的肠毒素（表 21.4）。一旦摄入含有 EHEC 菌株（如大名鼎鼎的 *E. coli* O157：H47 菌株）的食物或水后，这种生物就会在小肠中生长并产生 Verotoxin。Verotoxin 可以导致出血性痢疾和肾功能衰竭。在美国，*E. coli* O157：H47 菌株每年可导致至少 60 000 例感染，50 例死亡（表 29.5）。这种致病菌是导致儿童肾衰竭的首要原因。最常见的传染源是未烹调或烹调不足的肉类，尤其是大批量处理的绞肉。

美国主要的几次 *E. coli* O157：H47 疾病暴发与污染的绞碎牛肉有关，污染肉类的来源是当地的食品配给中心。污染的肉类制品在几个州内导致疾病。另外几次暴发源自

即食香肠中那些加工过但未经烹煮的熏牛肉（见 29.3 节）。牛肉是污染源，*E. coli* O157：H47 菌株很有可能来自于带菌的屠宰牛。2001 年，美国有 16 列记录在案的与 *E. coli* O157：H47 菌株相关的食物传染暴发，其中五例被确定是牛肉污染。2003 年，据美国农业部食品安全与检验局报道，在对 6584 个绞碎牛肉样品的 *E. coli* O157：H47 菌株检验中，有 20 例为阳性（0.03%）。此外，与乳制品、新鲜水果、生蔬菜相关的食物传染暴发也会有 *E. coli* O157：H47 菌株的参与。

E. coli O157：H47 菌株在肠道中生长并可在粪便中出现，因此也是潜在的由水传染的疾病来源。已经有过几例由于游泳区中粪便污染而导致的严重 *E. coli* O157：H47 菌株感染（表 28.2）。据报道也有一些暴发发生在日托机构，推测此处的传染途径是口-粪便接触。

其他致病性大肠杆菌

在发展中国家，痢疾经常在儿童中发病。旅行者腹泻也是其发病方式之一，这是一种在去发展中国家旅行的人中极为常见的肠道感染，可导致失水性腹泻。其主要的致病因子是产肠毒素大肠杆菌（ETEC）。ETEC 通常可产生两种热稳定的可导致腹泻的肠毒素中的一种。对在墨西哥旅行的美国公民的研究中，ETEC 的感染率经常超过 50%。疾病的主要载体通常是诸如新鲜蔬菜一类的食物（如沙拉中的莴苣）和水。旅行者中感染率很高的原因是当地公共水源的污染。当地的居民往往对这些感染性菌株有抗性，这无疑是因为他们与这些致病因子长期共处的结果（见 22.9 节）。在当地居民中，肠道中的分泌型抗体可以阻止这种致病菌成功定植，但是这些致病菌却很容易在未经免疫的人体中定植并导致疾病。

致肠病大肠杆菌（EPEC）可以导致婴儿和低龄儿童的腹泻，但不会导致侵入性疾病或产生毒素。肠侵入性大肠杆菌菌株（EIEC）可带来结肠侵入性感染，导致失水性甚至出血性痢疾。病原细胞被吞噬细胞吞噬后，可以躲过吞噬溶酶体对它的溶解，从而在细胞质中生长，并可入侵其他细胞（见 22.2 节）。这种侵入性疾病可导致痢疾，在发展中国家中很常见。

诊断、治疗与预防

E. coli O157：H47 菌株病在美国是一种可被检测的疾病（表 25.5）。针对 *E. coli* O157：H47 菌株感染建立起的一套诊断、治疗和预防方式，反映了目前对所有大肠杆菌致病菌株的操作流程。*E. coli* O157：H47 菌株感染的诊断一般通过粪便采样培养以及对 O 抗原和 H 抗原以及毒素的血清学检测（见 4.9 节和 24.7 节）。对菌株的进一步分型可以通过限制性片段长度多态性（RFLP）分析以及脉冲电场凝胶电泳（PFGE）来实现。

对致病性大肠杆菌感染一般的治疗是辅助性治疗，病情较严重时则采用抗生素缩短感染时间，消除感染。

最有效的消除由食物传染的 *E. coli* O157：H47 菌株肠道感染的方法是保证肉类经过充分烹煮，此时的肉应呈灰色或棕色而汤应是清亮的。如前文所述（见 29.2 节），美国已经核准辐射处理绞碎的牛肉作为消除或减少食物中感染性细菌的常规手段，这很大

程度上是由于 *E. coli* O157∶H47 已经涉及数例由食物传染的传染病。并且在牛肉的绞碎过程中，一头牛牛肉的污染可能会导致数头牛牛肉的污染。一般认为透射性辐射是唯一有效的消除绞碎过程中污染的手段，因为在绞碎过程中的搅拌会使致病菌均匀分布于肉的内部而不仅是表面。

总之，合理处理食物，净化水，以及正确的卫生习惯可以预防致病性大肠杆菌的传播；而远离当地水源及未烹煮过的食物则可以有效预防旅行者腹泻。

概念检查

致肠病大肠杆菌可以导致严重的食物传染病。一些特定的手段（如对绞碎牛肉的辐射处理）已经被采用，以阻止这些致病菌的传播。肉及肉制品的大规模处理方法使来自少数牲畜的污染物可以污染/传染大量的产品。

- 简述由大肠杆菌致病株 EHEC、ETEC、EPEC 以及 EIEC 导致感染的病理。
- 如何防止大肠杆菌致病菌对食用动物的感染?
- 为什么 *E. coli* O157∶H47 菌株被认为是一种危险的可被检测的病菌?

29.9 弯曲杆菌属

弯曲杆菌属（*Campylobacter*）中的细菌是美国最常见的细菌性食物传染疾病的病原菌。它们是一类具运动性，呈弯棒-螺旋状的革兰氏阴性菌，作为微好氧菌，它们生长于氧分压较低的环境中（见 12.14 节）。目前已知的致病菌有空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*，图 29.8）、大肠弯曲杆菌（*Campylobacter coli*）和胚胎弯曲杆菌（*Campylobacter fetus*）。空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌每年可导致 200 万例的细菌性腹泻（表 29.6）。因为胚胎弯曲杆菌是导致牛羊不育或自发性流产的主要原因，所以对经济有重要影响。

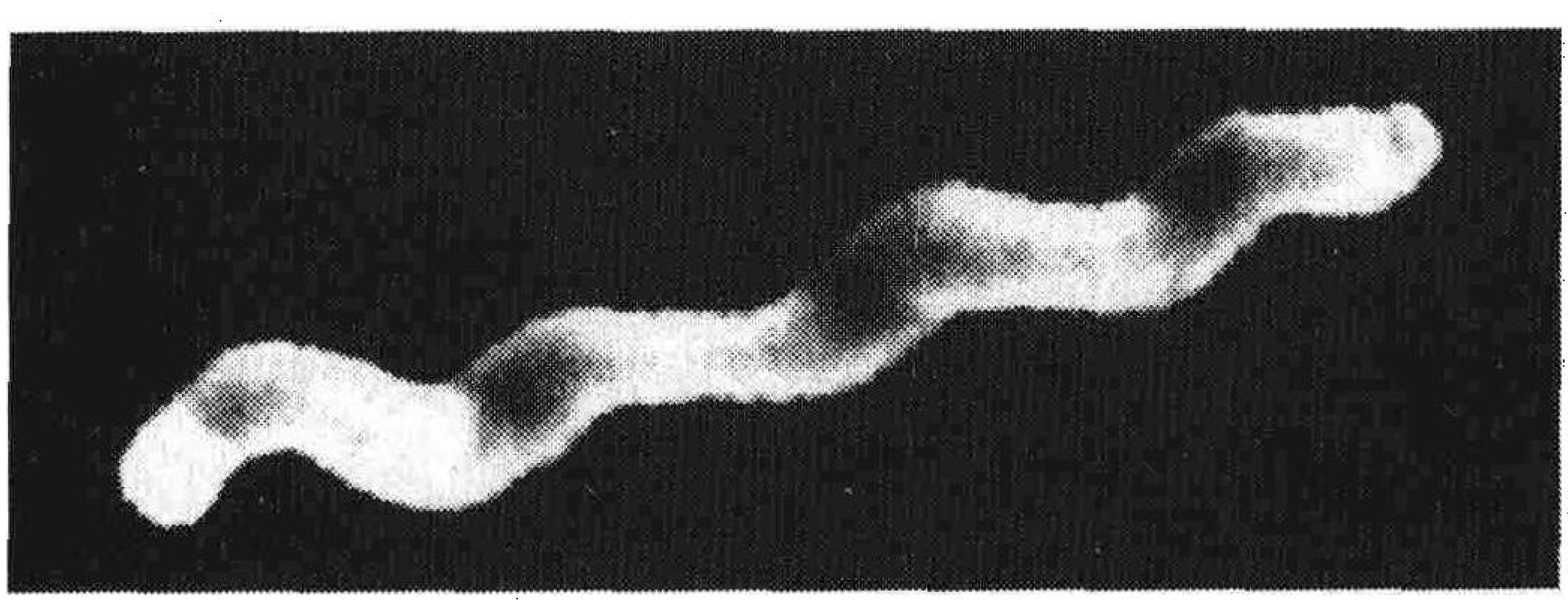


图 29.8 空肠弯曲杆菌的扫描电镜照片。每个革兰氏阳性的弯棒直径约为 1μm。

流行病学

弯曲杆菌通过被污染的食物传给人类，在家禽、猪肉、生蛤及其他有壳水生生物中，或未经氯气处理的表层水中最常见。空肠弯曲杆菌正常存在于家禽肠道，事实上几乎所有的家鸡和和火鸡均携带有这种生物。据美国农业部统计，90%的肉用火鸡、88%

的肉鸡及 32%的屠宰生猪可能都被弯曲杆菌感染，这种菌反而很少通过牛肉传播。弯曲杆菌也可感染狗等其他家养动物，导致比在人类中症状较轻的痢疾。弯曲杆菌感染婴儿的病例通常是由被感染的家养动物，尤其是狗引起的。

机体摄入弯曲杆菌后，该菌在小肠中繁殖，并侵入肠道上皮导致炎症，从而引发疾病。由于空肠弯曲杆菌对胃酸敏感，要引发感染细菌至少需要达到 10^4个。但是若从食物中直接摄入该致病菌，或在用药以减少胃酸分泌期间摄入该菌，则可能只需不到 500 个细菌就可引起感染。弯曲杆菌感染的症状包括高烧（通常超过 104℉或 40℃)、头痛、身体不适、恶心、小腹绞痛，以及伴随有失水和便血的严重痢疾。疾病通常会在发作7～10 天后平息。弯曲杆菌感染的自愈通常是彻底的，但复发的概率超过 25%。

诊断、治疗与预防

弯曲杆菌感染的诊断要求从粪便样品中分离致病菌，并利用生长依赖试验和免疫检测技术对其进行鉴定。由于空肠弯曲杆菌在婴幼儿中的高感染率，已经开发出多种选择性培养基及高特异性的免疫学技术来鉴定这种菌的阳性感染。对该病的红霉素治疗并不能缩短急性痢疾的发病周期，但可减少患者排泄弯曲杆菌的时间。讲究个人卫生，注意充分清洗未烹煮的禽类（以及任何与之直接接触的厨具）并彻底烹煮肉食可消除弯曲杆菌感染的可能性。

概念检查

弯曲杆菌感染是迄今为止最为常见的细菌性食物传染疾病。尽管可以自愈，这种疾病平均每年感染 200 万人口。

◆ 简述弯曲杆菌食物传染的病理。这种感染可能的后果是什么?

◆ 如何控制弯曲杆菌对食用动物的污染?

29.10 李斯特氏菌病

单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）可导致李斯特氏病（listeriosis)，这种胃肠道食物传染可能会引起菌血症和脑膜炎。单核细胞增生李斯特氏菌是一种短棒状不形成芽孢的革兰氏阳性菌，该菌耐酸、耐低温、兼性厌氧，并耐高盐浓度(见 12.9 节，图 29.9)。

流行病学

单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）在土壤和水中广泛存在，事实上任何新鲜食物都由于可能会有该菌的污染而不安全。新鲜食物在从生长到加工的过程中的各个阶段都可能被该菌污染。冷藏等在通常情况下可以降低微生物生长速度的方法对这种耐寒的生物无效，因此，肉、奶制品及新鲜农产品都可能被这种致病菌污染。李斯特氏菌病的常见来源是一些即食的加工食品如长期存放的肉制品和未经巴氏消毒的乳



图 29.9 单核细胞增生李斯特氏菌的革兰氏染色。每个革兰氏阳性的短棒状细菌直径约为 0.5μm。

制品（即使在 4℃冷藏）。

单核细胞增生李斯特氏菌是一种胞内致病菌。它们是在人类摄入被其污染的食物后经肠道进入体内的。吞噬细胞将其吞噬导致该细菌的生长和繁殖及巨噬细胞的裂解，随后该细菌再扩散至周围的细胞中。人体对单核细胞增生李斯特氏菌的免疫性主要来自由 T_H1 细胞介导的细胞免疫（见 22.8 节）。老人、新生儿、接受免疫抑制剂药物（如类固醇）治疗的患者或患有免疫抑制疾病（如艾滋病）的患者等细胞免疫机能低下的个体对李斯特氏菌病的敏感性会增加（见 26.14 节）。

尽管人们接触单核细胞增生李斯特氏菌的概率的确很高，但急性的李斯特氏菌病十分少见。急性的李斯特氏菌病特征是常导致脑膜炎的败血症。急性李斯特氏菌病的死亡率约为 20%。虽然每年仅有 2500 例急性李斯特氏菌病，但其中有 500 例死亡。几乎所有诊断出该病的患者均需要住院治疗。

诊断、治疗与预防

李斯特氏菌病的诊断需要从血液或脊髓液中分离培养到单核细胞增生李斯特氏菌。单核细胞增生李斯特氏菌在食物中可以通过直接培养或各种分子学方法如核糖体分型（见 11.11 节）和 PCR（见 7.9 节和 24.12 节，表 24.9）来鉴定。青霉素、氨苄类的抗生素治疗，或三甲氧苄二氨嘧啶-磺胺甲氧唑混用对李斯特氏病均有疗效。

李斯特氏菌病的预防主要包括召回被污染的食物并采取措施限制单核细胞增生李斯特氏菌在食物加工点的污染。单核细胞增生李斯特氏菌对热和辐射敏感，因此易清除掉食物原料及食物加工器具上的污染。但由于该致病菌分布广泛，若不对最终的食物制品进行消毒仍不能完全消除食物被污染的危险。

通常建议免疫力受损的人避免食用未经巴氏消毒的乳制品和即食的肉制品。李斯特氏菌病还经常导致自发性流产。为了保胎，通常建议孕妇避免可能污染单核细胞增生李斯特氏菌的食物。

概念检查

单核细胞增生李斯特氏菌是一类在环境中广泛分布的微生物。它很少感染正常人，但是却可给免疫力受损的个体带来严重疾病甚至死亡。

◆ 正常人接触李斯特氏菌后可能的后果是什么？

◆ 哪类人群对李斯特氏菌感染最为敏感？为什么？

◆ 简述李斯特氏菌病的病理。

29.11 其他食物传染的疾病

其他的一些微生物和感染性因子——细菌、病毒、寄生虫及其他种类，均参与由食物传染的疾病，我们在此处仅介绍其中少数几种。

细菌

表 29.6 列出了其他一些可以使人类患上食物传染疾病的细菌。小肠结肠炎耶尔森氏菌（*Yersinia enterocolotica*）是家养动物肠道中常见的致病菌，它可以污染肉类和乳制品从而导致食物传染的疾病。小肠结肠炎耶尔森氏菌可以导致肠热病——一种可危及生命的严重疾病。蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）可以产生两种能导致痢疾和呕吐的肠毒素。蜡状芽孢杆菌可在大米等富含碳水化合物的食物中生长。在置于室温下的食物中生长时，棒状的革兰氏阳性菌产生的芽孢就可以发芽，随之产生足以致病的毒素。对食物进行再加热可以杀死蜡状芽孢杆菌，但其毒素依然保持活性。蜡状芽孢杆菌可导致类似于产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）的感染（见 29.6 节）。志贺氏菌属每年可导致将近 10 万例由食物传染的严重的侵入性肠胃炎，称为志贺氏菌病（shigellosis）。进食被弧菌（*Vibrio*）污染的贝类，也可导致食物中毒。

病毒

大部分的食物传染疾病被认为是由病毒引起的。一般而言，病毒性食物传染疾病的症状是痢疾性肠胃炎，通常伴随有恶心和呕吐。这种病通常可很快自愈，一般在 24～48h 内（被称为“24h 病菌”）。在美国，症状较轻的食物传染疾病大多数是由类诺沃克病毒（Norwalk-like virus）（表 25.8 和 26.11 节）引起的，在每年约 1300 万由食物传染的病例中它们占了 900 多万例。轮状病毒、星状病毒和 A 型肝炎病毒每年一共可导致 100 000 例食物传染疾病。这些病毒在人类的肠中寄生，通常可以由排泄物传播至食物和水中。和其他许多食物传染疾病一样，预防的要点是正确处理食物，勤洗手，并使用洁净的水来处理新鲜食物。

原生动物

由食物传染的重要原生动物疾病已经在表 29.6 中列出。原生动物寄生虫如吸吮贾第虫（*Giardia lamblia*）、微小隐孢子虫（*Cryptosporidium parvum*）及圆孢球虫

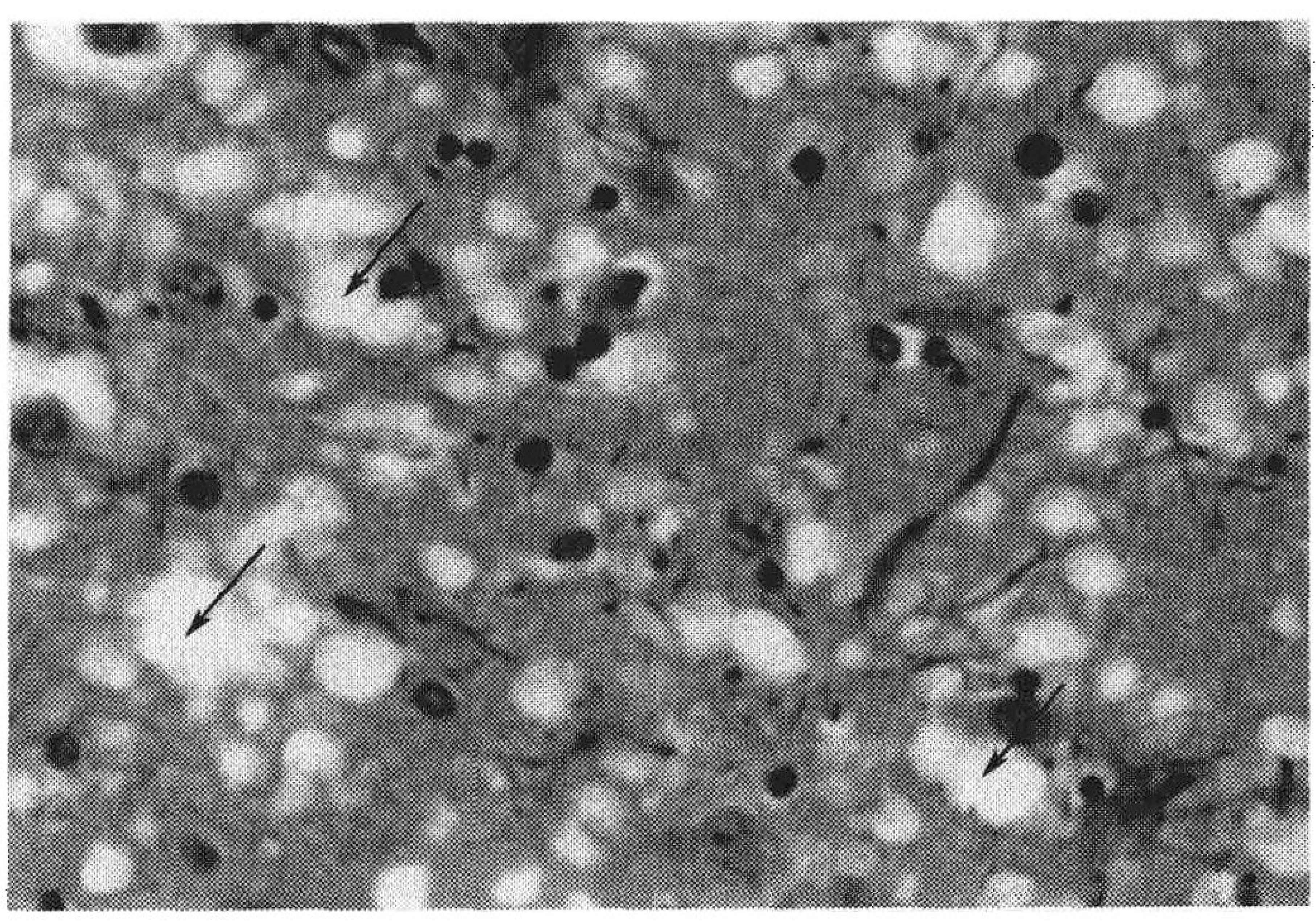
(*Cyclospora cayetanensis*) 等均可以由食物传染，这些食物可能是由冲洗、灌溉或喷洒农作物的水中的排泄物污染的。水果等新鲜食物通常是这些致病原生动物的来源。在前面的章节中我们已经介绍过贾第虫病和微小隐孢子虫病（cryptosporidiosis）（见 28.6 节和图 28.11，图 28.12）。圆孢球虫病（cyclosporiasis）是一种急性肠胃炎，它是一种重要的新出现的疾病。在美国，大多数病例都是由于进食新鲜的农产品造成的，而这些农产品通常是由国外进口的。

刚地弓形虫（*Toxoplasma gondii*）是一种由猫粪传播的疾病，但也在生肉或烹煮不彻底的肉中被发现。对于大多数人，刚地弓形虫感染只导致轻微的肠胃炎并可以自愈，但产前感染却通常会导致各种并发症，包括失明和死胎。免疫力受损的患者通常也会表现出急性的刚地弓形虫病。

朊病毒、牛海绵状脑病及新变异型库贾氏病

朊病毒（prion）是一种蛋白质，它可能是由宿主自身的蛋白质采用异常构象而形成的，可以抑制正常蛋白质的功能，并破坏神经组织（见 9.14 节）。人类朊病毒疾病以一些神经学症状为特点，包括精神抑郁、运动共济失调和痴呆。

由食物传染的人类朊病毒病就是大家所知的新变异型库贾氏病（new variant Creutzfeldt-Jakob disease，nv-CJD）。并已知这种病与食用感染了牛海绵状脑病（bovine spongiform encephalopathy，BSE）的牛肉有关，BSE 就是常被称为“疯牛病”的一种朊病毒病。新变异型库贾氏病是一种慢作用的退化性神经系统紊乱，在与 BSE 朊病毒接触后通常会有数年的潜伏期。在英国和欧洲其他国家有将近 200 人患上这种新变异型库贾氏病。但在美国还没有发现与食肉相关的新变异型库贾氏病。尽管朊病毒感染的机制尚未完全明了，但已知食用染病牛肉中的朊病毒可以激发人体中与之结构、功能相关的蛋白质改变构象，导致蛋白质功能紊乱而引发疾病（图 9.29）。BSE 和 nv-CJD 的晚期症状均以脑组织中的巨大空泡为特点，使脑组织呈海绵状，而 BSE 也正因此得名（图 29.10）。



USDA/A.Jenny/PHIL

图 29.10　患有牛海绵状脑病的母牛的脑部切片。注意脑中的孔状空泡，正是这些空泡使其大脑呈海绵状。

在欧洲大陆和英国已经检出约 180 000 头牛感染 BSE。在加拿大也发现几个被感染的病例。在美国，对屠宰后的牛进行脑组织例行检查时，也发现少数被感染的病例。在欧洲和美国，所有已知或被怀疑感染有 BSE 的牲畜均被销毁。禁止给牲畜饲喂含肉粉或骨粉的规定似乎已阻止了新的 BSE 病例在欧洲的蔓延，并使该病在北美地区也保持很低的发病率。传染性的朊病毒很可能是在饲喂那些以牛或其他动物的肉和骨头制成的食物（这是不允许被人类食用的）时被转移到食用动物中的。

BSE 的诊断可以通过朊病毒敏感小鼠检测，或神经组织活体切片的免疫组织化学/显微图像分析来完成。

概念检查

可以导致食物传染疾病的感染因子有 200 多种。大多数的食物传染疾病是由病毒引起的。一些细菌、原生动物和朊病毒也可以导致由食物传染的疾病。

- 指出最可能与食物传染疾病相关的病毒。
- 在美国，怎样才可能防止朊病毒对食用动物的污染？

复习题

1. 依其易腐烂性将食物划分成哪三大类？（见 29.1 节）
2. 描述保存食物的主要方法。针对每一种保存方法举一个与之相应的例子。（见 29.2 节）
3. 区分由发酵生产的食物的主要种类。（见 29.3 节）
4. 分辨食物传染和食物中毒的不同之处。（见 29.4 节）
5. 简述葡萄球菌食物中毒的发病机制。针对如何预防该病提出建议。（见 29.5 节）
6. 指出两种主要梭菌食物中毒类别。二者之中哪种最常见，哪种最危险？为什么？（见 29.6 节）
7. 导致食物传染的沙门氏菌的可能来源有哪些？（见 29.7 节）
8. 食品加工厂在生产绞碎肉时一般采用什么手段来控制 *Escherichia coli* O157：H7 菌株的生长？消费者呢？（见 29.8 节）
9. 弯曲杆菌比其他任何一种细菌导致的食物传染都要多，为什么（至少指出一种原因）？（见 29.9 节）
10. 指出导致单核细胞增生李斯特氏菌感染的食物来源。哪种人属于李斯特氏菌病高危人群？（见 29.10 节）
11. 为何病毒因子如此普遍地与由食物传染的疾病相关？（见 29.11 节）

应用题

1. 分别指出保存易腐烂、半易腐烂、不易腐烂食品的最佳保存方法。考虑保存成本以

及食品本身价值等经济因素。

2. 挑选一种食物，设计一种可降低食物中水活度而不使其失水的保存方法。
3. 产气荚膜梭菌食物中毒需要摄入产气荚膜梭菌，菌体在肠道中生长及芽孢的萌发。芽孢的萌发能刺激毒素的产生。这种疾病是一种食物中毒么？是否应该将其归为食物传染一类？
4. 处理不当的土豆色拉经常是葡萄球菌病或沙门氏菌病的来源。请阐明土豆色拉被金黄色葡萄球菌和沙门氏菌污染的几种途径。
5. 肉毒梭菌需要厌氧环境产生毒素。请指出含有肉毒梭菌生长所必需的厌氧环境的食物保存方法。反之，再指出几种抑制肉毒梭菌生长的好氧的食品保存方法。还有什么因素可影响肉毒梭菌的生长？
6. 为什么通常不用抗生素来治疗沙门氏菌病？根据沙门氏菌的生长环境和抗生素的可用性来解释你的答案。同时要考虑潜在的抗生素抗性问题。
7. 指出预防致病性大肠杆菌感染的必需措施。重点放在 *E. coli* O157：H7 菌株以及食物的正确处理、烹调和食用等方面。
8. 设计从活家禽或禽类食品中去除弯曲杆菌污染的方案。解释非弯曲杆菌污染的家禽的好处以及你的计划中可能会遇见的问题。
9. 一般情况下李斯特氏菌病只有在由 T_H1 细胞介导的免疫受损时才发病。请解释为什么会出现这种情况？请设计一种疫苗来预防李斯特氏菌病。你的疫苗在李斯特氏菌病易感人群众中是否有效？
10. 请指出病毒性食物传染疾病（尤其是类诺沃克病毒）发病率高的潜在原因。设计一个除去食物中类诺沃克病毒的方案。
11. 请指出监测朊病毒之类的潜伏性感染因子时的固有困难。朊病毒是否可以被除掉？如果能的话，怎么去做？

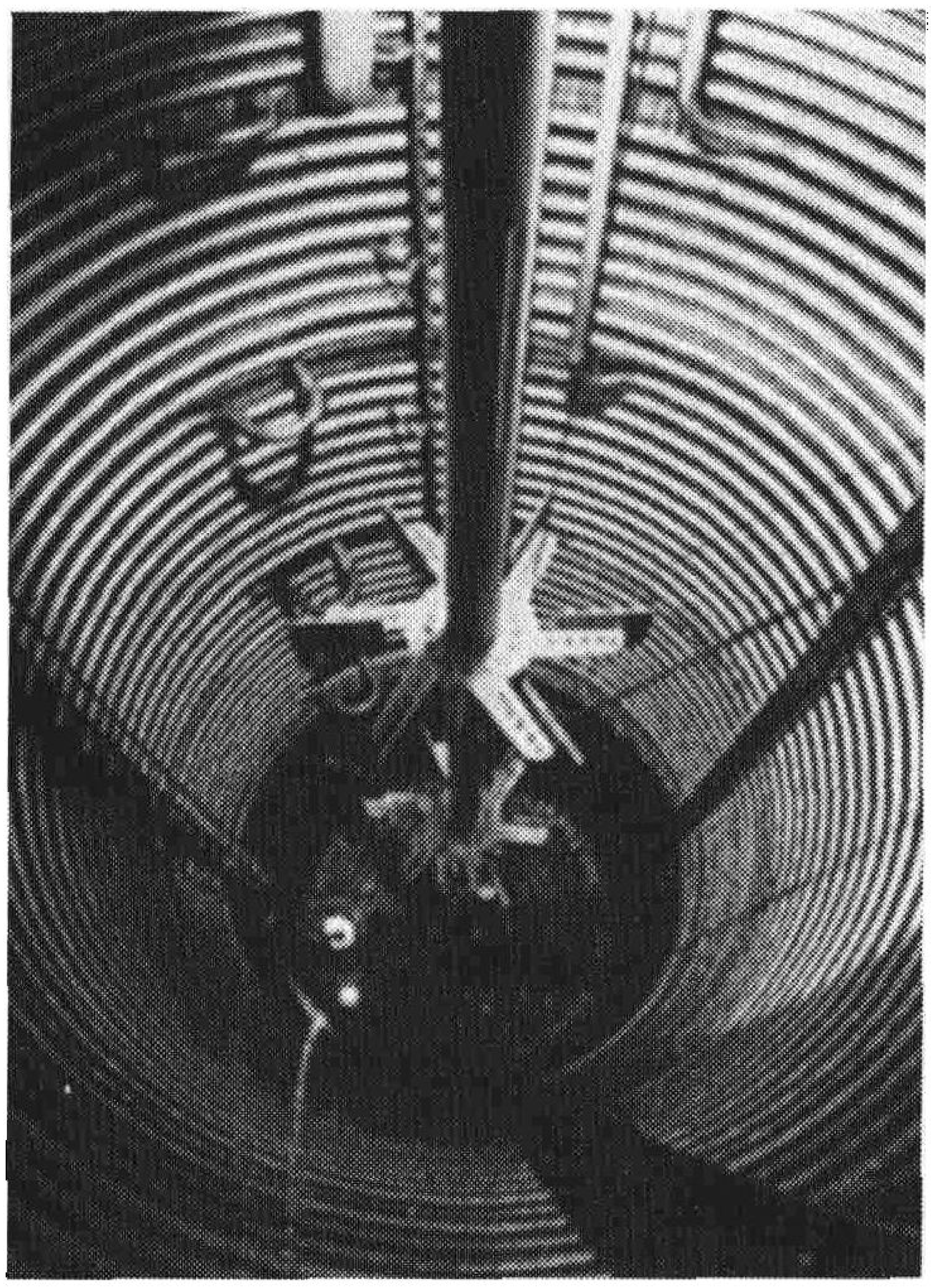
（徐海津　译，乔文涛　校）

第六部分

以微生物进行工业生产和科学研究

30

工业微生物学



在工业微生物学中，通过大规模来实现经济性生产是可能的。为了使微生物发酵产品具有竞争性价格，所使用的生产培养基必须廉价，同时生产容器必须大。图中所显示的是一个大型工业发酵罐内部配有的冷却和混合装置。

词汇表

天冬苯丙二肽酯（aspartame）：由天冬氨酸和苯丙氨酸组成的一种非营养增甜剂，后者为甲酯
β-内酰胺抗生素（β-lactam antibiotic）：指包括青霉素的一类抗生素，含有 4 个 β-内酰胺杂环的成员
生物催化（biocatalysis）：利用微生物来完成特定的化学合成
生物合成青霉素（biosynthetic penicillin）：给生物体提供特异侧链前体物，专门进行青霉素的生产
生物转化（biotransformation）：利用微生物完成化学反应，这个化学反应是非常昂贵的或非生物手段所不能完成的
酿造（brewing）：生产酒精饮料，如将麦芽通过发酵生产啤酒
广谱抗生素（broad-spectrum antibiotic）：用于治疗广泛的各类细菌疾病的抗微生物药物
通用化学品（commodity chemical）：低价的，主要以批发形式销售的化学品，如酒精
蒸馏饮料（distilled beverage）：指经蒸馏被浓缩的酒精饮料
胞外酶（exoenzyme）：由微生物产生的并分泌到环境中的酶
极端酶（extremozyme）：一种或多种在化学或物理极端情况，如高温或低 pH 下仍具有功能的酶
发酵（fermentation）：在工业过程中，无论是需氧还是厌氧的任何一种大规模的微生物生长过程
发酵罐（fermentor）：进行工业发酵的容器
固定化酶（immobilized enzyme）：固定在固体载体上的酶，将底物转化为产物
工业微生物学（industrial microbiology）：大规模利用微生物生产具有商业价值产物的学科
天然青霉素（natural penicillin）：由青霉菌产生的，不添加侧链前体物的青霉素母核结构
初级代谢产物（primary metabolite）：生长阶段分泌的代谢物
蛋白酶（protease）：通过水解作用可以降解蛋白质的酶
放大试验（scale-up）：指从小型实验室水平到大型工业发酵过程的工业转化过程
次生代谢物（secondary metabolite）：在生长期末期和稳定期内分泌的代谢产物
半合成青霉素（semisynthetic penicillin）：用微生物发酵和化学合成衍生的原料合成的青霉素
四环素（tetracycline）：含有 4 个萘环的一类抗生素

I 工业微生物和产物形成

工业微生物学（industrial microbiology）是典型地利用微生物大规模生长来生产有价值的工业产品或进行重要的化学转化。工业微生物方法旨在提高微生物已经具备的代谢反应能力，大多数情况下以过量生产感兴趣的产物为目的。工业微生物学不同于微生物生物工程，在生物工程中，通过基因操作的方法产生新的微生物产品，而且这些产品中的大部分不是微生物自然产生的（第 31 章）。

生物催化（biocatalysis）一词是用于描述在工业微生物学中利用微生物来完成的实际反应。本章我们将介绍几种工业生物催化以及大规模微生物培养存在的某些问题。我们首先对工业生物及产品做一概述，工业微生物起源于酒精发酵工艺，如制造啤酒和果酒。随后，微生物工艺得到发展，用于制造药物（如抗生素）、食品添加剂（如氨基酸）、酶和化学品（如丁醇和柠檬酸）。我们将看到工业微生物学家是如何在工业规模上

使微生物工艺尽可能经济。

30.1 工业微生物及其产物

工业微生物学中使用的主要生物是真菌（酵母和霉菌）（第 14 章）和某些原核生物，特别是链霉菌属中的成员（见 12.24 节）。工业微生物是能够高产量合成一种或多种产物的代谢专家。为了形成这种高度的代谢特异性，科学家通常利用突变和重组手段遗传改造工业微生物菌株，这些改变可以增加生物产生特异性产物的产量。

用于生物催化过程的所有微生物菌株最终来源是自然界，但是实际的工业菌株已与最初分离的野生型菌株大为不同，一旦有价值的工业微生物被开发出来，那么这些高产的菌株将被保藏在工业微生物实验室中。另外，一些大的国家微生物培养物保藏中心，如美国模式培养物保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）和德国微生物菌种保藏中心（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen，DSMZ）可以为教学、科研和工业生产提供菌种。

当一个新的生物催化工艺获得专利权时，能完成该工艺的菌株必须储藏到一个国家保藏中心。可是由于某些原因，其中最重要的是产权问题，因此，保藏的菌株不是实际高产的生产菌，而是一株替代菌或是能完成这个工艺的低产菌株。

有用工业微生物的特性

适合于工业过程的微生物除了能生产令人感兴趣的物质外，还必须具有其他特性：①首先生物体必须能够在大规模培养中生长并有产物形成；②最好能产生孢子或一些其他繁殖细胞的形式，以便生物体能很容易地接种到大的发酵罐中。它还必须能迅速生长并在相对较短的时间内产生所需要的产物。

工业上应用的生物体必须能在相对便宜的液体培养基中生长并可大量繁殖，许多工业微生物工艺可利用其他工业的废弃碳源作为大规模培养基的主要或附加成分，包括玉米浆（corn steep liquor，谷物水磨工业的产物，富含氮源和生长因子），乳清（whey，牛奶工业的废料，富含乳糖和矿物质）。

工业微生物不应该是致病的，特别是对人类及重要的经济动植物不应致病。由于在工业发酵罐中存在较高的细胞密度，实事上不可能避免对罐外环境的污染，这样病原体就成为潜在的灾难性问题。

最后，工业微生物应该能够进行基因操作。在工业微生物学中，提高产量主要是通过突变和筛选的遗传方法获得。因此，一个遗传稳定并且易于操作的微生物具有明显的优势。

工业产物的例子

有工业价值的微生物产物（图 30.1）包括微生物细胞本身。例如，培养酵母用于食品、面包发酵、酿造（图 30.24）及酶等细胞产物，如葡萄糖异构酶在生产高果糖浆中非常重要，药理活性剂如抗生素、类固醇和生物碱，特殊化学药品和食品添加剂，如天冬苯丙二肽酯（食物和甜饮料），通用化学品（commodity chemical）——大量生产

的廉价的化学品，如乙醇、柠檬酸和许多其他的化学品。

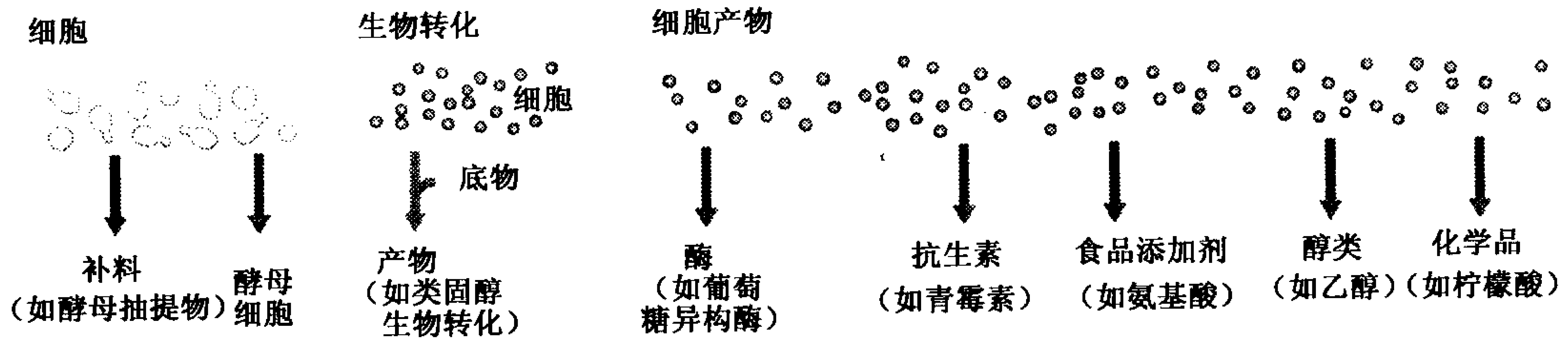


图 30.1　工业微生物学/生物催化的产物。产物可以是细胞本身或由细胞产生的产物，在生物转化中，细胞可将一种特定的底物从一种形式转化为另一种形式。

概念检查

工业微生物必须能产生高产量令人感兴趣的产品，在廉价培养基上可大量快速地生长，同时可以进行基因操作，并且无致病性。工业产品有很多，包括细胞和细胞产物。

◆ 为什么工业微生物应该能进行基因操作?

◆ 列举 3 个重要的工业生物催化产品。

30.2 初级和次生代谢物

在生长周期的什么时间产生工业上有用的代谢物呢？6.1 节中，我们介绍了微生物的生长过程并描述了不同的阶段：停滞期（lag phase）、对数期（exponential phase）和稳定期（stationary phase）。本节我们将描述在工业过程中微生物生长和产物形成，会看到有些产物是在对数生长过程中形成的，而有些只是在对数生长停止以后产生。

微生物代谢物有两种类型：初级的和次级的。初级代谢产物（primary metabolite）是微生物生长期形成的，而次生代谢物（secondary metabolite）是在生长期末期或稳定期内形成的（图 30.2）。乙醇是一个典型初级代谢物，乙醇是酵母菌或某些细菌无氧代谢的产物（见 5.10 节），也是作为能量代谢的一部分形成的。因为只有能量产生，生物才能生长，所以乙醇形成是与生长平行进行（图 30.2a）。

与酵母生产乙醇相比，在一些生物催化中，目的产物不是在活跃生长期产生，而是在稳定期产生。这些次生代谢物是一些非常普遍和有工业价值的重要代谢物（图 30.2b），特征如下：

1. 次生代谢物不是生长和繁殖所必需的。

2. 次生代谢物的形成特别取决于生长条件，尤其是培养基组分。次生代谢物合成的抑制作用经常发生。

3. 产生的次生代谢产物通常是一组结构相关的物质。例如，发现链霉菌属（*Streptomyces*）某些种的单个菌株可以产生 30 多种相关的但不相同的蒽环类抗生素。

4. 次生代谢物常可获得惊人的过量产生，但与初级代谢相关的初级代谢产物通常

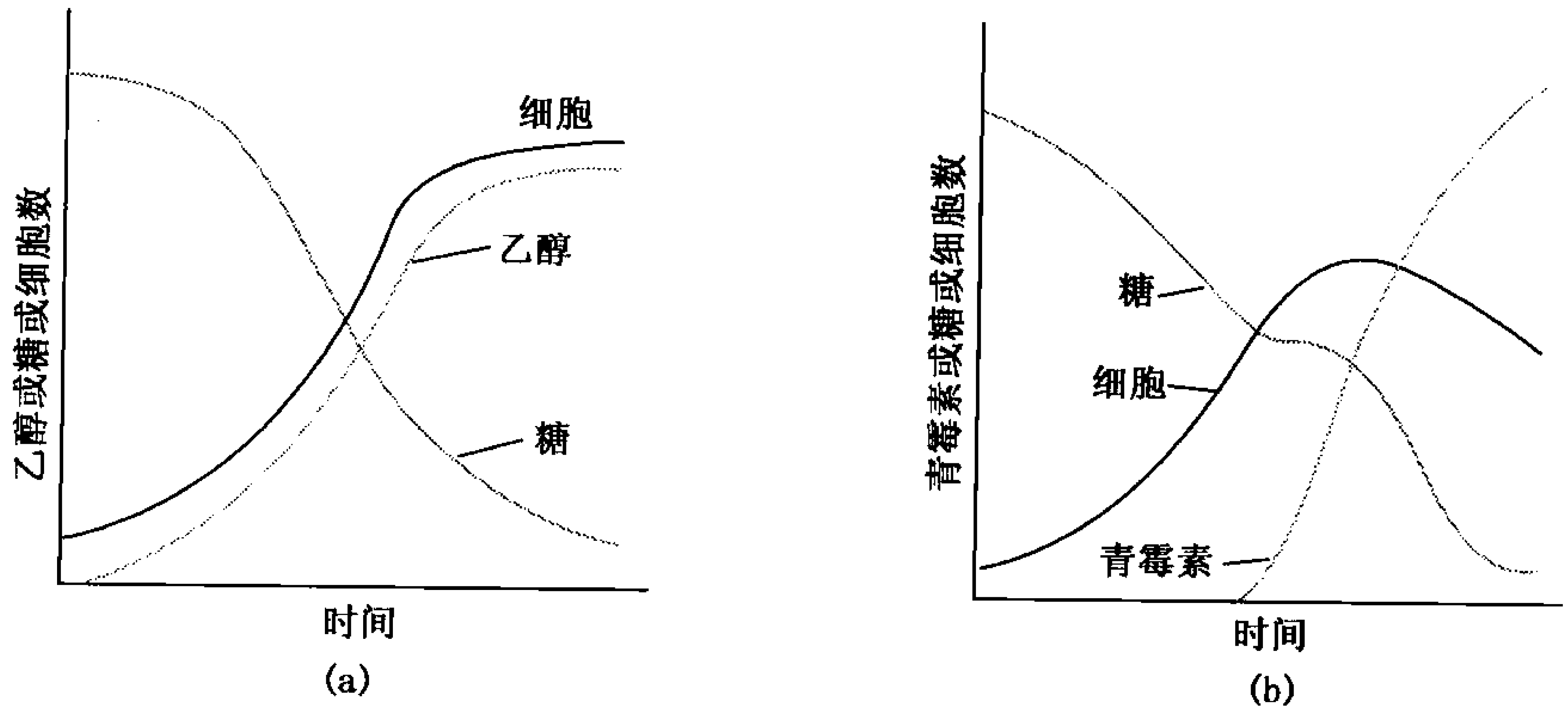


图 30.2 初级代谢产物与次生代谢物二者产生的对比。(a) 酵母的乙醇形成——初级代谢产物的例子。(b) 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 产生青霉素——次生代谢物的例子。注意青霉素是如何直到中后期形成的 (图 6.8)。

不能过量产生 (图 30.2)。

初级代谢和次生代谢途径

大部分次生代谢物是复杂的有机分子，它们的合成需要大量的特异性酶反应。例如，众所周知，至少有 72 步独立的酶反应参与抗生素四环素 (tetracycline) 的合成 (见 30.6 节)，红霉素 (erythromycin) 的合成有 25 步之多，这些反应没有一个反应是在初级代谢中发生的，而这些次生代谢物的代谢途径确实产生于初级代谢之外，因为这些起始物来源于主要的生物合成途径。图 30.3 显示了芳香族氨基酸合成的主要初级代谢途径和几种抗生素合成的次生代谢途径之间的关系，从中可以看出，许多抗生素来源于初级代谢物 (图 30.3)。

概念检查

初级代谢产物和次生代谢物分别产生于活跃细胞的生长期和稳定期的开始，许多有经济价值的微生物产物都是次生代谢物。

- 青霉素是初级代谢物还是次生代谢物？为什么？
- 初级代谢物和次生代谢物哪一种类型更容易过量产生？为什么？

30.3 大规模发酵的特点

进行工业反应的容器称为发酵罐 (fermentor)。在工业微生物学中，发酵 (fermentation) 一词是指任何大规模的微生物反应，无论是否是生物化学的发酵。事实上，大多数工业发酵是好氧的反应，因此，完成工业发酵的罐统称发酵罐，而参与的微生物称发酵体 (fermenter)。

发酵罐的大小从小的 5～10L 的实验室规模 (图 30.4a) 到大的 500 000L 的工业生

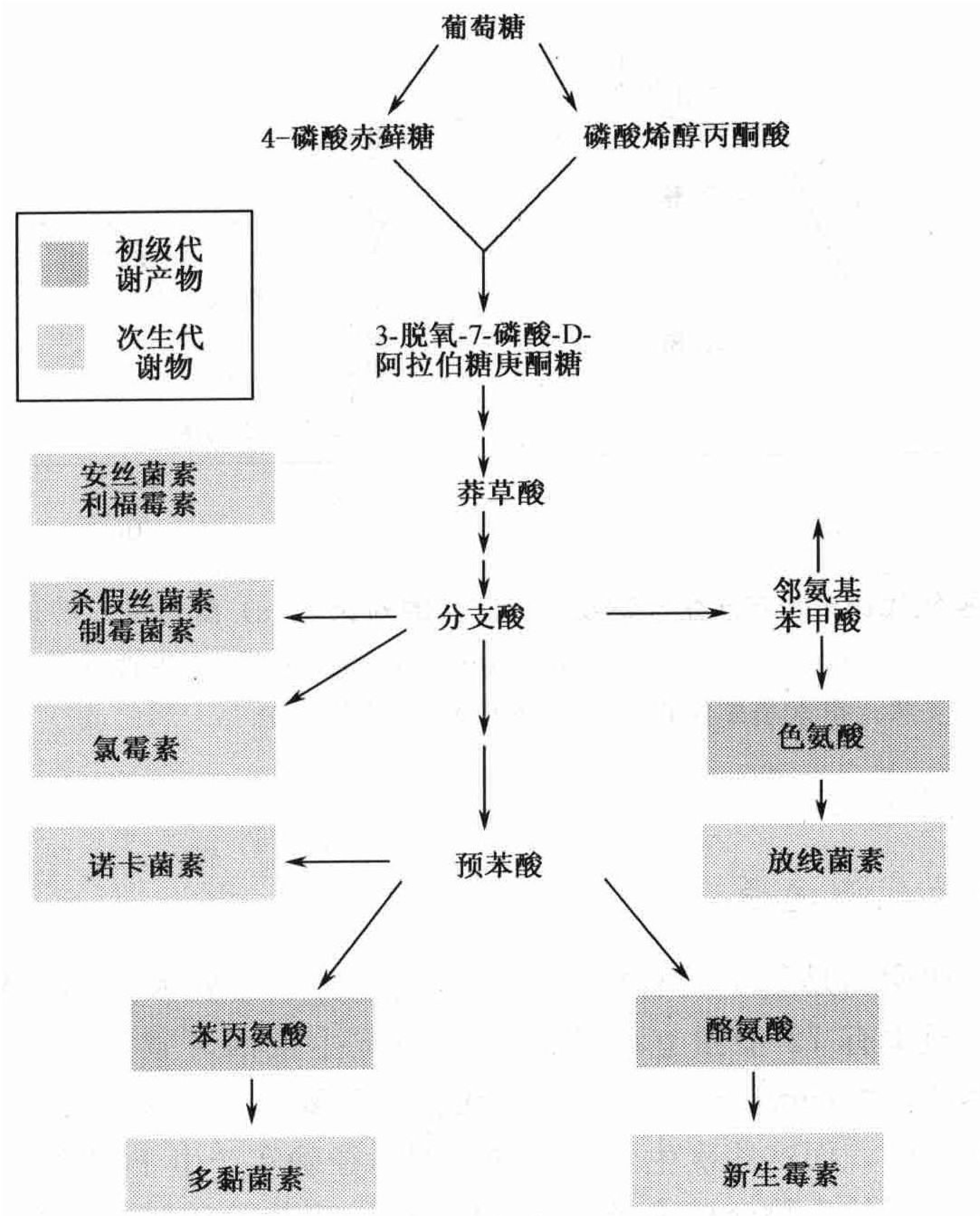


图 30.3　芳香族抗生素。芳香族氨基酸合成的初级代谢途径（见 5.16 节）和含有芳香环各种次生代谢物形成的关系。这是出现在各种不同微生物中的进行图，没有一种生物体能够产生所有的这些次生代谢物，并且在各种情况下，许多独特步骤存在于氨基酸和抗生素之间。

产规模不等。所使用的发酵罐的大小根据工艺和其进行的方式而定，表 30.1 概括了一般微生物发酵的罐体大小。

表 30.1　各种不同工业产品所需罐体的大小

发酵罐大小/L	产　品
1～20 000	诊断酶、用于分子生物学的底物
40～80 000	某些酶、抗生素
100～150 000	青霉素、氨基糖苷抗生素、蛋白酶、淀粉酶、类固醇转化、氨基酸、葡萄酒、啤酒
200 000～500 000	氨基酸(谷氨酸)、葡萄酒、啤酒

工业发酵罐主要分为两类，即厌氧（anaerobic）过程使用的发酵罐和好氧（aerobic）过程使用的发酵罐。厌氧发酵罐（anaerobic fermentor）除了排放发酵中产生的热的装置外几乎不需要特殊的装置，而好氧发酵罐（aerobic fermentor）需要大量的精密装置来保证搅拌和获得足够的通气，因为大多数工业发酵是好氧的，所以我们这里主要讨论好氧发酵罐。

好氧发酵罐的结构

大规模工业发酵罐一般采用不锈钢制造，这种发酵罐是一个大的圆柱体，顶部和底部密封，内部安装了各种管子和阀门（图 30.4b）。由于培养基灭菌和散热是发酵成功操作的关键，所以发酵罐通常有一个外部的冷却套，可使水蒸气（为了灭菌）和冷凝水（为了冷却）循环。对于非常巨大的发酵罐，仅通过冷却套不能达到较好的散热效果，所以必须安装内部管道使水蒸气和冷凝水流出。

发酵罐一个重要部分是通气系统。对于大规模装置，氧气转运到整个生长培养基中是关键的，必须采取精密的预防措施确保适当的通气。由于氧气在水中溶解度是有限的，并且发酵罐中具有较高的微生物群体密度，所以培养需要大量的氧气。

使用两种独立的装置可以保证足够的通气量：一种通气装置称为分布器（sparger)，另一种搅拌装置称为叶轮（impeller）（图 30.4b)。典型的分布器是在一个金属环或喷嘴上有许多小孔，在高压下，过滤无菌的空气（或富含氧气的空气）通过它进入发酵罐，空气以许多小泡的形式进入罐内，氧气从中扩散到发酵液中。在小型发酵罐中，只使用一个分布器就可以有效地保证足够的通气量，但是在工业规模的大型发酵罐中，用叶轮搅拌是必不可少的（图 30.4c)。搅拌起两个作用：一是使气泡与发酵液混合；二是使生物体与发酵液混合，从而确保微生物细胞均匀接触养料。

发酵控制和监测

任何微生物工艺必须进行监控以确保正常进行，工业发酵罐的严格监控非常重要，因为它们花费较大。在大多数情况下，不仅要检测菌体生长和产物合成的情况，而且随着过程进行，要改变环境参数来控制发酵过程，通常监测的环境因素包括温度、氧浓度、pH、细胞量和产物浓度。

对大规模发酵的菌体生长期和产物形成期，获得实时数据是非常必要的（图 30.5b)。例如，在发酵过程中也许要改变一种或多种环境参数，或者以一定速度添加养料来平衡生长。利用计算机在线处理这些数据就可以在准确的时间添加养料以保持较高的产物量。

也可以利用计算机来模拟发酵过程。运用数学模型可以迅速地检查各种参数对菌体生长和产物产量的影响。利用模型，工业微生物学家可以修改参数，观察它们是如何影响发酵过程的。通过这种方法，发酵中的许多变化可以在屏幕上廉价地研究，而不是在试验厂或工业化工厂中以相当高的代价来研究。

概念检查

大规模工业发酵存在许多工程问题。好氧过程需要搅拌和通气装置，微生物过程必须连续监控以保证所需产物的预期产量。

◆ 大规模发酵中为保证适当的通气使用了什么类型的设备？

◆ 工业发酵中什么参数需要监测，什么调整需要计算机控制？

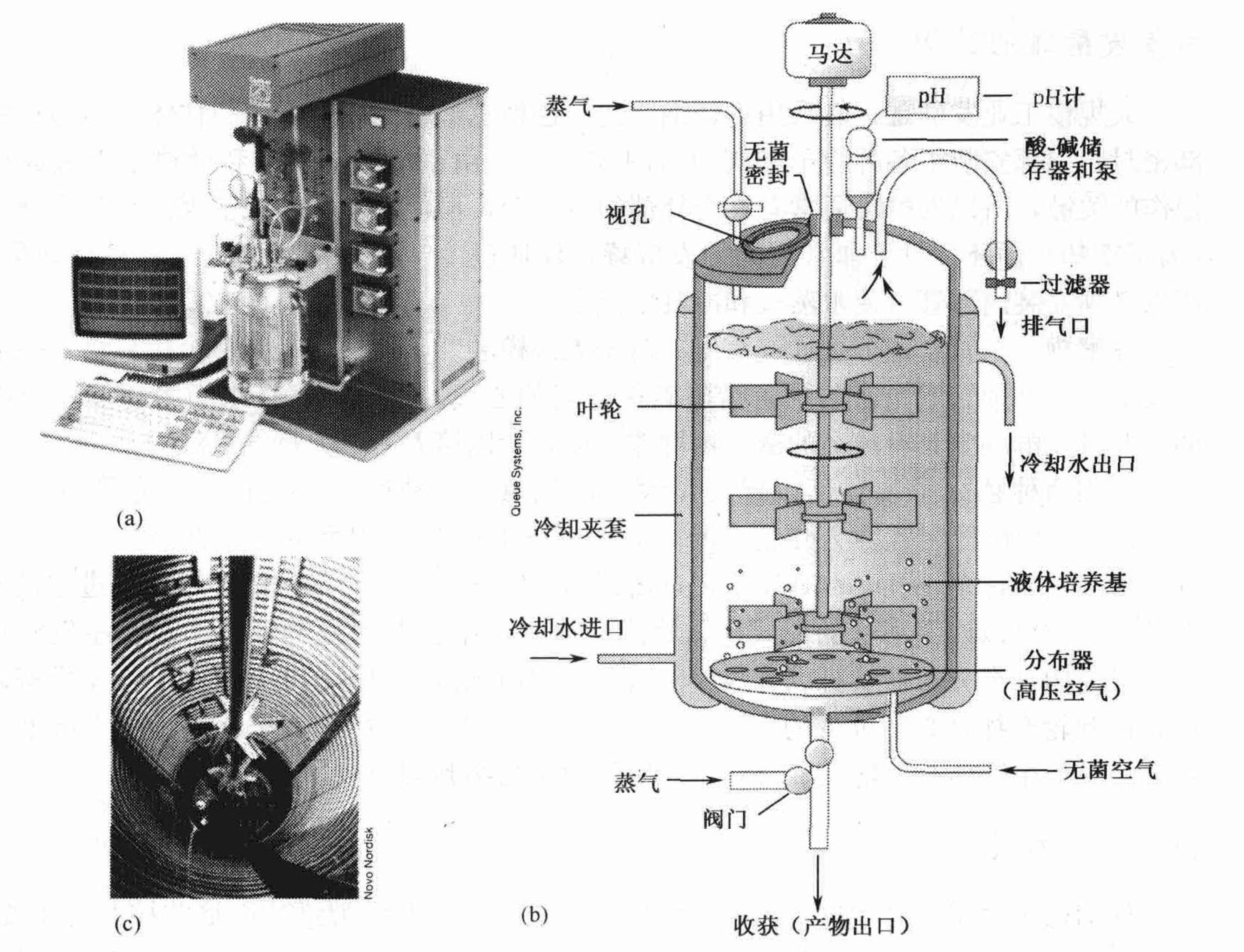
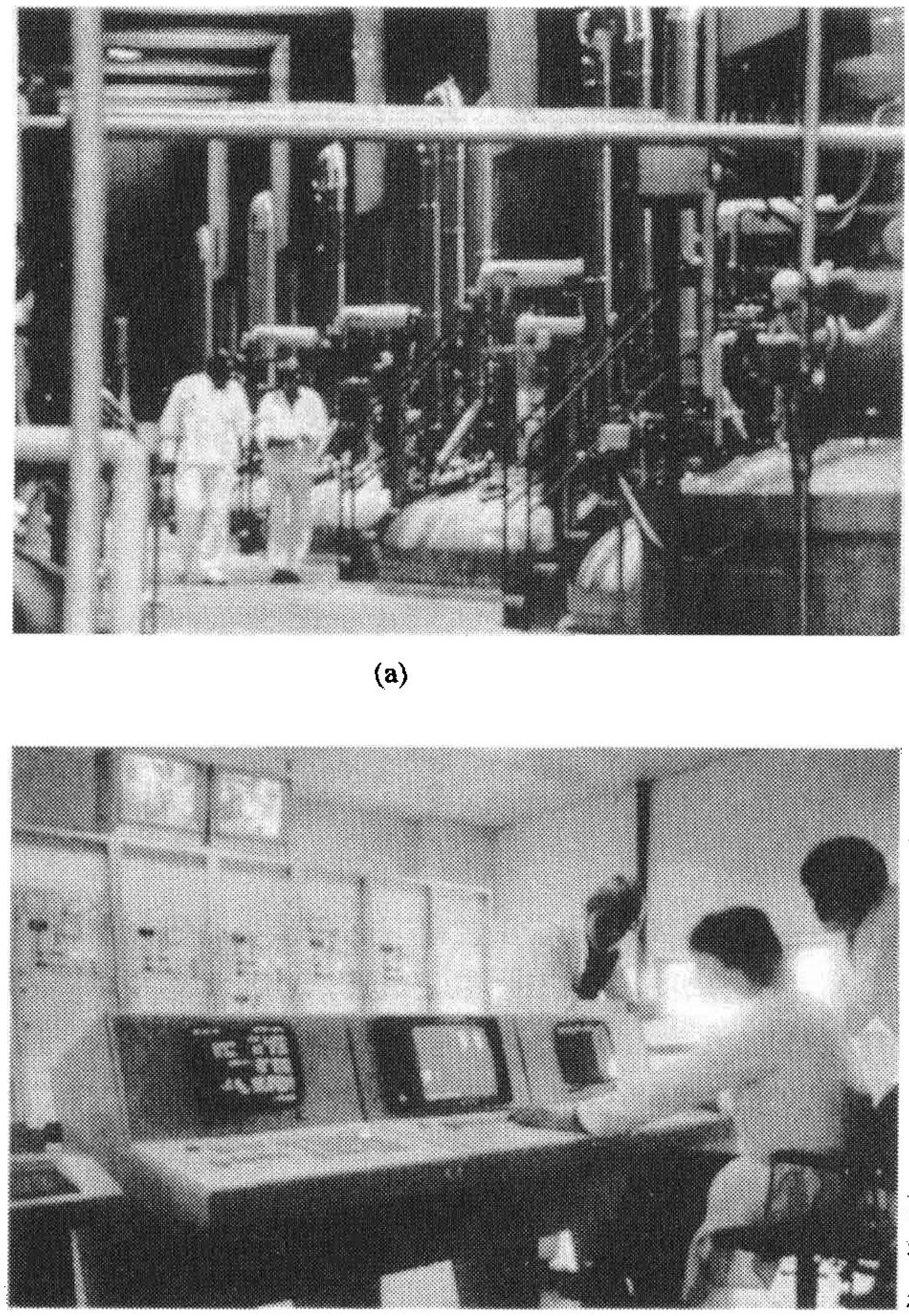


图 30.4 发酵罐。(a) 小型实验发酵罐，体积为 5L。(b) 发酵罐示意图，显示了通气和工艺控制的结构和装置。(c) 工业发酵罐内部结构，显示了叶轮，内部加热和冷却管道。在典型的工业发酵中，通气和冷却是在线监测和调节的关键部分，营养水平和 pH 也可以监测并根据需要进行自动调节。

30.4 发酵放大试验

工业微生物学重要的一个方面是从小规模的实验室装置向大规模的工业装置转化过程，此过程称为放大试验 (scale-up)，对放大试验中问题的了解是非常重要的，因为在大规模发酵罐 (图 30.5) 和小规模实验装置 (图 30.6) 中，生物催化过程几乎没有相同的方式。工业过程中的放大试验是生化工程师的任务，他们熟悉气体传送、流体动力学、搅拌和热力学。放大试验不仅需要有生产生物体的生物学知识，而且也需要有发酵罐设计和操作的物理学知识。

放大试验的许多问题涉及适宜的通气和搅拌。工业过程中这些必需因素在小的实验室烧瓶中要比大的工业发酵罐中更容易完成。特别是大型发酵罐中的氧气传送更加困难，由于大多数工业发酵是好氧的，所以有效的氧气传送是关键。随着营养丰富的培养基在工业过程中的应用，可获得较高的生物量，从而导致了较高的需氧量，如果通气量减少，即使是短暂的，培养也会经历暂时的无氧条件，导致严重的后果，产物量降低。



(a)

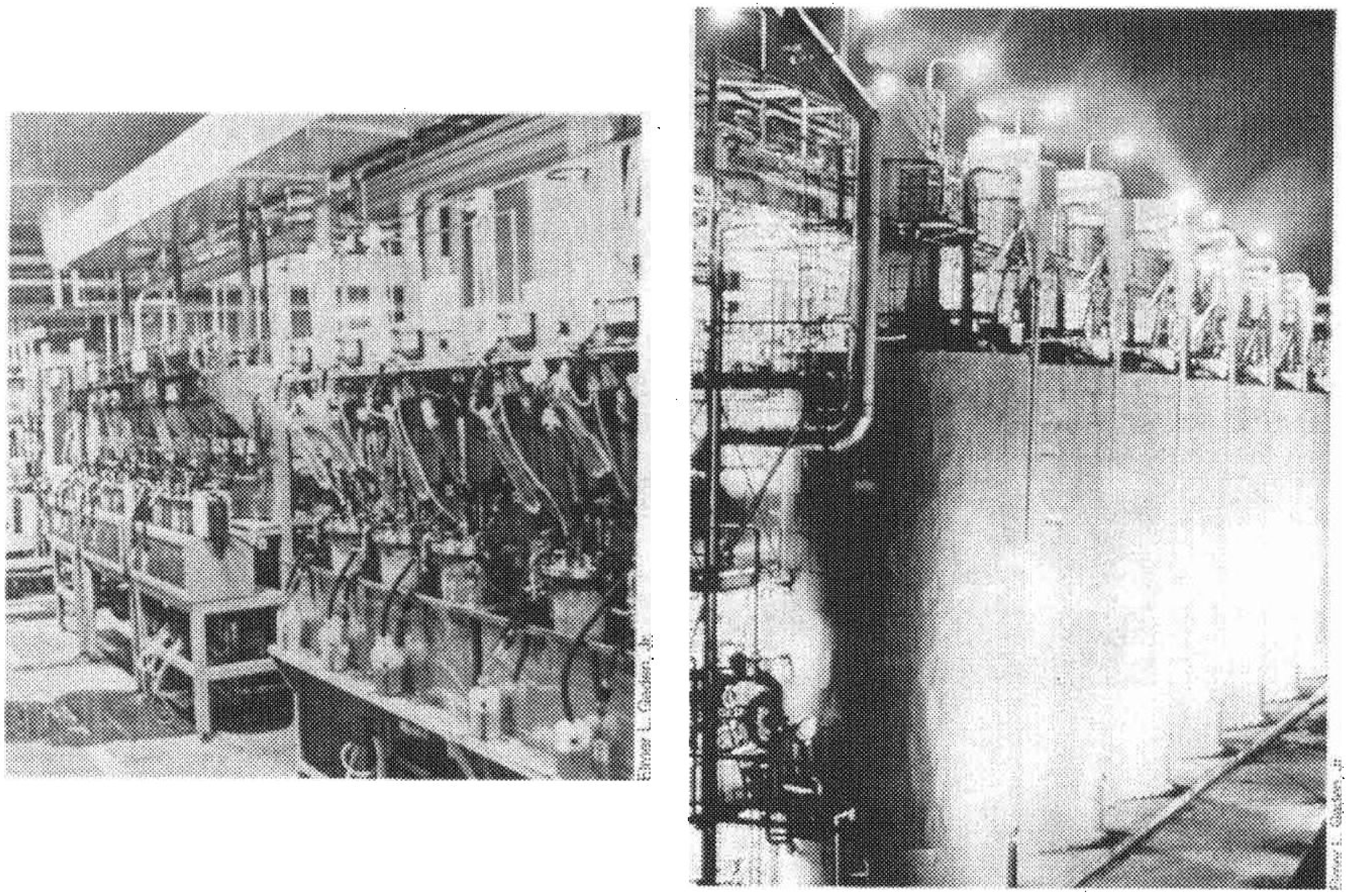
(b)

图 30.5　工业规模发酵。（a）一个大型工业发酵工厂。只显示了发酵罐的顶部，发酵罐有几层楼高。（b）大型工业发酵工厂的计算机控制车间。

放大试验过程

从实验室到工业发酵罐过程的转移涉及几个阶段。起始于实验室烧瓶（the laboratory flask），是非常小规模的操作，但通常能最先表明一个反应过程是否具有工业价值。然后转到实验室发酵罐（the laboratory fermentor），通常是玻璃的 1～10L 小规模发酵罐，是进行放大试验的首次尝试（图 30.4a 和图 30.6b）。实验室发酵罐可以试验各种培养基、温度、pH 等差异，廉价是因为所投入的仪器和培养液花费较小。

当试验在实验室发酵罐中成功后，将转入中试试验阶段（the pilot plant stage），通常在 300～3000L 的发酵罐中进行，这个条件更接近工业化规模，但花费仍不是主要因素。最后，转入工业发酵罐（commercial fermentor），体积通常为 10 000～500 000L（图 30.5a 和图 30.6b）。在所有的阶段中，通气需要非常密切地检测，当放大试验过程从烧瓶到生产发酵罐时，每一步都要仔细地检测氧动力学，由此来决定发酵中体积的增加是如何影响氧气需求的。



(a)　　(b)

图 30.6　研究和生产用发酵罐。(a) 用于工艺研究的一排小型研究发酵罐。发酵罐是带有不锈钢顶部的玻璃容器，小的塑料瓶用于收集流出液。(b) 日本用于工业生产乙醇的一排大型露天工业化规模发酵罐 (240m^3)。由于它们的规格有很大的不同，所以相同的微生物发酵在这两种不同大小的发酵罐中在操作上可能会有很大的不同。

概念检查

放大试验是渐近的将有用的工业发酵从实验室规模扩大到生产规模的过程。在放大试验研究中，通气是监控的特别重要的方面。

◆ 典型的实验室发酵罐、中试试验发酵罐和工业发酵罐的尺寸有什么不同?

Ⅱ 用于医疗卫生产业的主要工业产品

我们现在认为工业微生物学的产物起始于抗生素，工业化生产的微生物产物，对医疗卫生产业最重要的是抗生素，抗生素的生产是世界上一个巨大的产业，在此过程中不断增长的大规模微生物培养的许多重要原理首次被研发出来。

30.5 抗生素：分离和特性

正如第 20 章所讨论的，抗生素是微生物产生的化学物质，它能杀死或抑制其他微生物的生长，抗生素作为治疗传染性疾病药剂的发展与任何其他单一的发展相比，在医学应用上更具影响力。抗生素是典型的次生代谢物（见 30.2 节)。有经济价值的抗生素主要是由丝状真菌和放线菌产生的（见 12.24 节)。表 30.2 列出了大规模工业发酵所生

产的重要抗生素。

表 30.2 工业上生产的一些抗生素[a]

抗生素	产生的微生物[b]
杆菌肽	地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)(EFB)
头孢菌素	头孢霉(*Cephalosporium* spp.)(F)
氯霉素	化学物质合成[由委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)产生的](A)
放线菌酮	灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)(A)
环丝氨酸	兰花链霉菌(*Streptomyces orchidaceus*)(A)
红霉素	暗红产色链霉菌(*Streptomyces erythreus*)(A)
灰黄霉素	灰黄青霉(*Penicillium griseofulvin*)(F)
卡那霉素	卡那霉素链霉菌(*Streptomyces kanamyceticus*)(A)
洁霉素	林肯链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)(A)
新霉素	弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)(A)
制霉菌素	诺尔斯氏链霉菌(*Streptomyces noursei*)(A)
青霉素	产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)(F)
多黏菌素	多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)(EFB)
链霉素	灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)(A)
四环素	龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)(A)

a. 这些抗生素结构信息见第 12 章和图 20.12。
b. EFB 为形成内生孢子的细菌；F 为真菌；A 为放线菌。

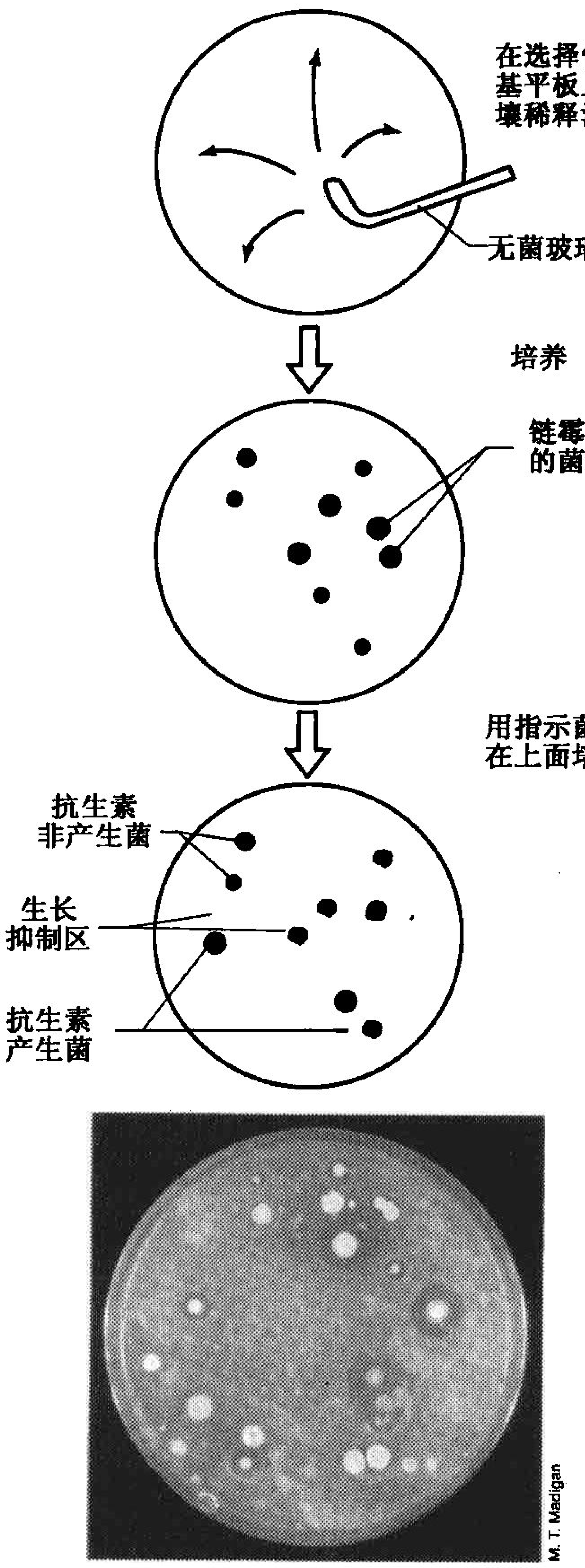
寻找新的抗生素

尽管目前制药公司利用计算机模拟进行药物开发（见 20.13 节），但传统的方法是通过筛选（screening）发现抗生素。该方法中，许多可能产生抗生素的微生物分离株是从自然界中通过纯培养获得的（图 30.7a），检测这些分离株是否产生抗生素是通过观察它们是否产生抑制检测菌株生长的扩散物质。所用的检测菌株是从各种不同细菌类型中筛选出来的，具有代表性或与细菌病原体相关。

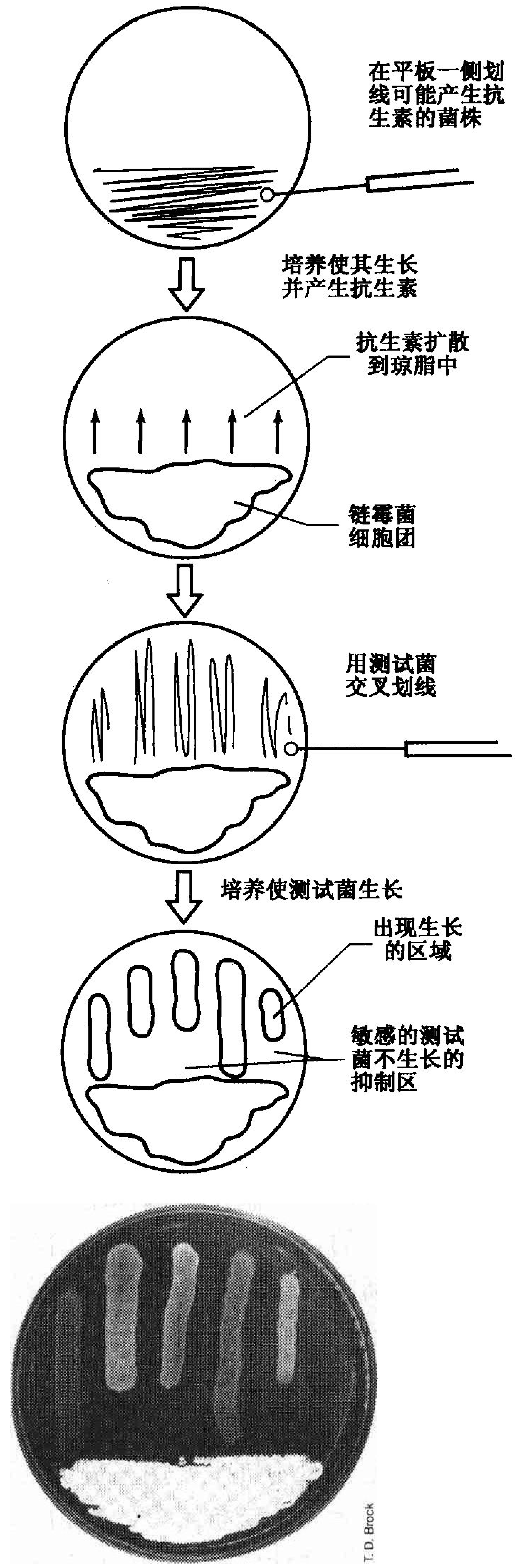
测试新的分离株产生抗生素的经典方法是交叉划线法（cross-streak method），然后那些被证明产生抗生素的分离株将被进一步研究，以确认其产生的抗生素是否是新的。获得的大多数分离株产生的是已知的抗生素，所以工业微生物学家必须快速地鉴定出这些生物体，以便不浪费时间和资源研究它们。一旦发现产生新的抗生素的菌株，就需要生产足够量的抗生素用来进行结构分析，然后在感染动物身上测定其毒性和疗效。遗憾的是，大多数新抗生素的动物实验会失败，但有少数证明具有医用价值，并进行工业化生产。据估计仅由链霉菌属（*Streptomyces*）的种产生的不同抗生素的数量就超过了 100 000 种，而且发现新抗生素的研究正在不断地继续。

纯化

一种抗生素能进行工业化生产首先必须能在大规模工业发酵罐中成功生产（放大试



(a)



(b)

图 30.7　分离和鉴定抗生素产生菌。(a) 用选择培养基分离链霉菌，并用一种指示菌来鉴定抗生素产生菌。照片中，多数菌落是链霉菌，一些菌落周围有指示菌[金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)] 生长抑制区说明该菌产生抗生素。(b) 检测一种生物抗生谱活性的方法。抗生素产生菌 (链霉菌属的种) 在平板 1/3 处交叉划线，培养，当生长良好后，把测试菌垂直于链霉菌划线，进一步培养，几种菌在生长的链霉菌菌落附近不能生长，表明链霉菌产生一种抗生素使其不能生长。测试菌 (从左到右) 是：大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)。

验，见 30.4 节）。接下来的挑战是有效地纯化产物，由于发酵液中只存在相对少量的抗生素，因此必须有精确的提取和纯化抗生素的方法（图 30.8）。如果抗生素溶于有机溶液，那么可通过抽提成为小体积溶剂进行相对简单的纯化；如果抗生素不可溶，可通过吸附、离子交换或化学沉淀等方法从发酵液中分离（图 30.8）。所有方法的目的是最终获得高纯度的结晶产物。按照程序，如果痕量的微生物细胞与抗生素一起纯化出来需要进一步纯化使其去除。

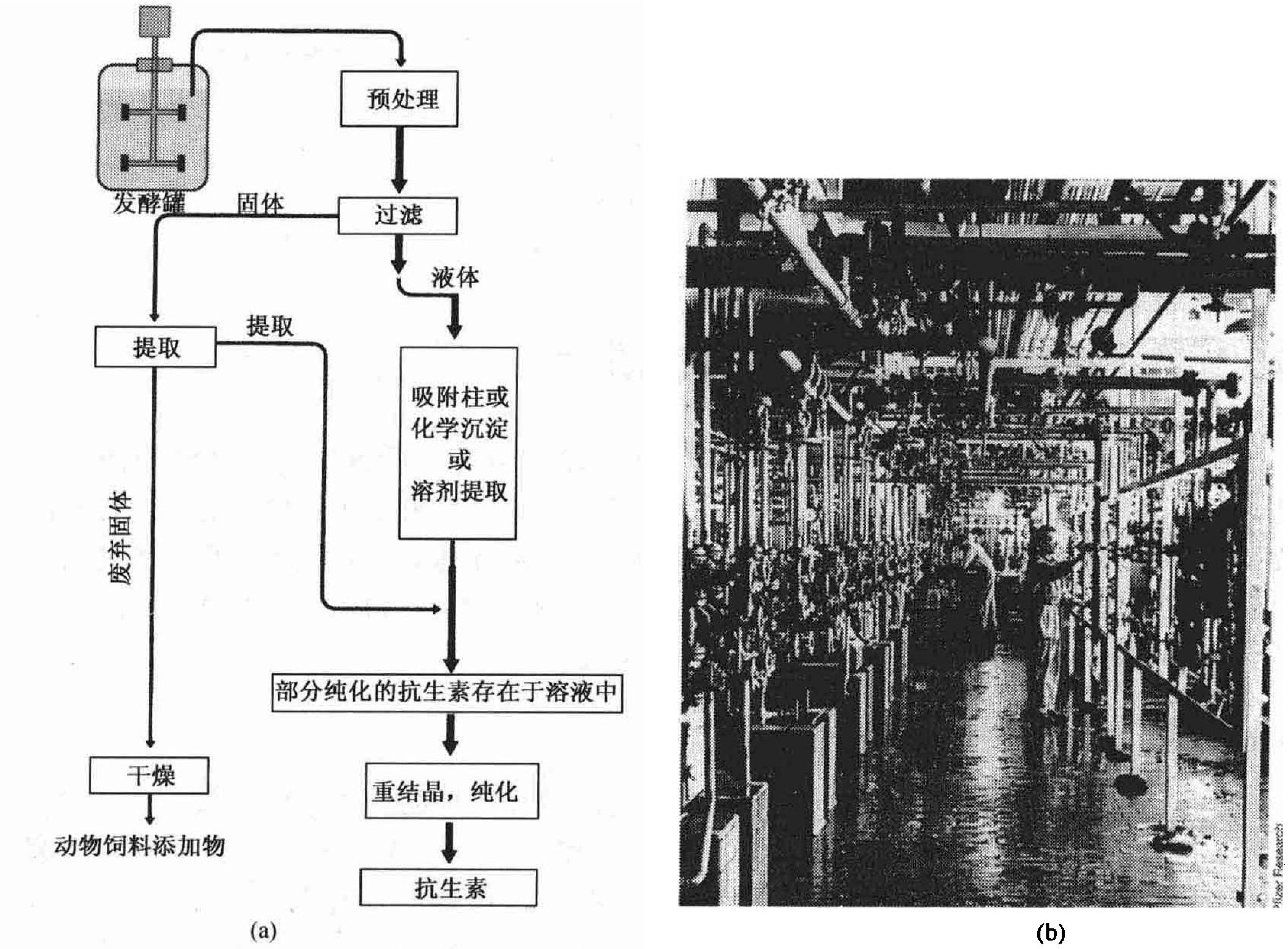


图 30.8 抗生素的纯化。（a）提取和纯化的总过程。（b）从发酵液中用溶剂提取抗生素的装置。在抗生素的成功生产中，有效的工程措施与微生物因素同样重要。

提高产量

刚刚从自然界分离出来的产生抗生素的菌株，很少能够产生可立即投入工业生产的足够高浓度的所需抗生素，工业微生物学家的一个主要任务是分离高产菌株。菌株筛选包括原始培养菌的诱变、平板接种突变型和产生抗生素突变型的测定。

基因工程极大地改善了获得高产菌株的耗时过程。基因扩增通过载体如质粒把所感兴趣的基因拷贝插入细胞中变为可能（第 31 章），调控过程的改变也可以提高产量。但是用遗传手段提高抗生素产量的一个困难是合成大部分抗生素的生化合成途径是由许多基因参与的一系列步骤，改变哪些基因，或增加哪个基因会增加产量都不清楚，因此，通过基础研究鉴定已知生化途径中的限速或关键调控步骤是首要的。同时，因为这可能是一个较长的过程，所以仍在继续进行实验研究来获得高产菌株。

事实上，最终产量对于所有的制药业都是一个关键问题。尽管一种抗生素或其他产物的工业化生产开始以后，通常还要继续研究来鉴定或产生更高产的菌株，或改造某些途径的过程提高产量。虽然制药与日用化学品或农业产品相比是小规模生产，然而在最短的时间内寻找最高产量仍是经济要求所必需的。

概念检查

抗生素工业生产开始于抗生素生产菌株的筛选，一旦新的生产菌株确定，抗微生物剂的纯化和化学分析就会进行，如果新抗生素在体内有生物活性，那么工业微生物学家将寻找高产菌株或用遗传方法改变生产菌株提高产量，以达到工业发酵可接受的水平。

◆ 大部分产抗生素微生物的自然生境是什么？

◆ 在寻找新抗生素的过程中筛选这一词是什么意思？

30.6 青霉素和四环素的工业化生产

一旦一种新的抗生素结构特征被鉴定，并且通过动物实验证明有医学疗效而且无毒，便具备了进入人体临床实验的可能。实际上，为临床实验做准备的所有过程要花许多年，如果新的药物证明在临床上有效，那么它就具备了进行工业生产和投放市场的条件。如青霉素、四环素，这些抗生素很早便通过了这些检验，目前，这类抗生素成吨地作为医用和兽用。这里我们着重介绍它们的生产。

β-内酰胺抗生素：青霉素及其相关产物

正如 20.8 节所讨论的，青霉素是具有 β-内酰胺环特征的一类 β-内酰胺抗生素（β-lactam antibiotic），是由青霉属（*Penicillium*）和曲霉属（*Aspergillus*）的不同霉菌（真核生物）和某些原核生物产生（图 30.9）。临床上应用的青霉素有几种不同类型，多数是生物催化反应的产物，后来有机化学家进行了化学修饰。这样对于合成的一组青霉素，每一种都有其各自的特殊的临床特征（图 30.9）。

所有青霉素的母核结构是 6-氨基青霉烷酸（6-aminopenicillanic acid，6-APA），包含一个四氢噻唑环和与之相连的 β-内酰胺环（图 30.9）。6-APA 在 6 位携带不同侧链，如果在青霉素发酵中未加入侧链前体物，就会生产出天然青霉素（natural penicillin）（图 30.9）。加入含有侧链前体物的溶液可使发酵更明确，这样只生产出一种所需青霉素，在这种情况下，所生产的产品称为生物合成青霉素（biosynthetic penicillin）（图 30.9）。

为了生产最有用的、对革兰氏阴性菌有活性的青霉素，人们联合使用发酵和化学方法，生产出了半合成青霉素（semisynthetic penicillin）(图 30.9)。在此过程中，微生物产生的天然青霉素，通过酶法或化学方法开环产生 6-APA，后者可加入侧链进行化学修饰（图 30.9）。半合成青霉素具有许多重要的临床优势，包括具有典型的广谱活性，大多数可以口服而不需要注射等，广泛应用的处方药氨苄青霉素（ampicillin）就是一个很好的例子。由于这些原因，半合成青霉素占有目前青霉素的主要市场。

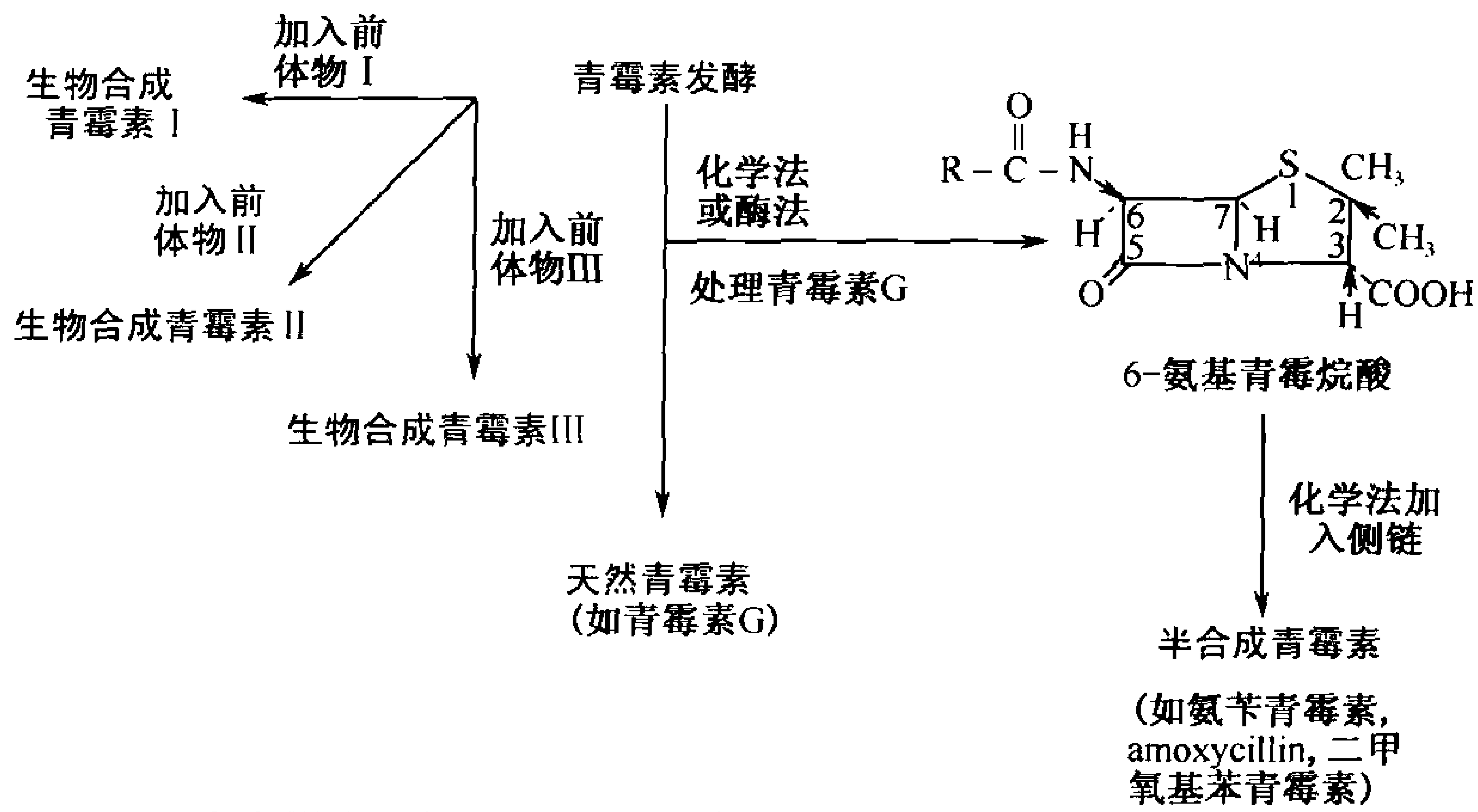


图 30.9　工业生产青霉素。棕黑色显示 β-内酰胺环。正常的发酵产生天然青霉素，如果在发酵过程中加入特异的前体物，则可形成各种不同的生物合成青霉素。半合成青霉素是由化学法加入一种特异的侧链于 6-氨基青霉烷酸核上的“R”基团。半合成青霉素有最大的临床用处，因为对革兰氏阴性菌具有典型的抗性，可以口服。美国工业青霉素生产使用产黄青霉的高产菌株。

β-内酰胺抗生素的生产

青霉素 G 是由霉菌产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）在 40 000～200 000L 发酵罐中生产的，青霉素生产过程是高度好氧过程，高效通气是必需的。青霉素是典型的次生代谢物，在生长期只有极少量青霉素合成，但一旦碳源接近耗尽，青霉素合成期开始（图 30.10），通过补加碳源和氮源，可将青霉素合成期延长至几天（图 30.10）。

大多数青霉素生产培养基的主要成分是玉米浆（corn steep liquor），这种物质含有氮源及几种生长因子，碳源通常是从乳清获得的乳糖（图 30.10）。高水平的葡萄糖将抑制青霉素的生产，而高水平的乳糖不抑制，因此，乳糖是大量存在的初始碳源，当乳糖变成限制因子，并且发酵罐内的生物量达到较高时，发酵后期流加葡萄糖会使青霉素达到最高产量。青霉素分泌到培养基中，通过过滤除去细胞后，培养基的 pH 会降低，用有机溶剂抽提抗生素，浓缩到溶剂中后，抗生素又被抽提到碱性水溶液媒介中，进一步浓缩，结晶，用这种方法可较容易地获得高纯度的青霉素。

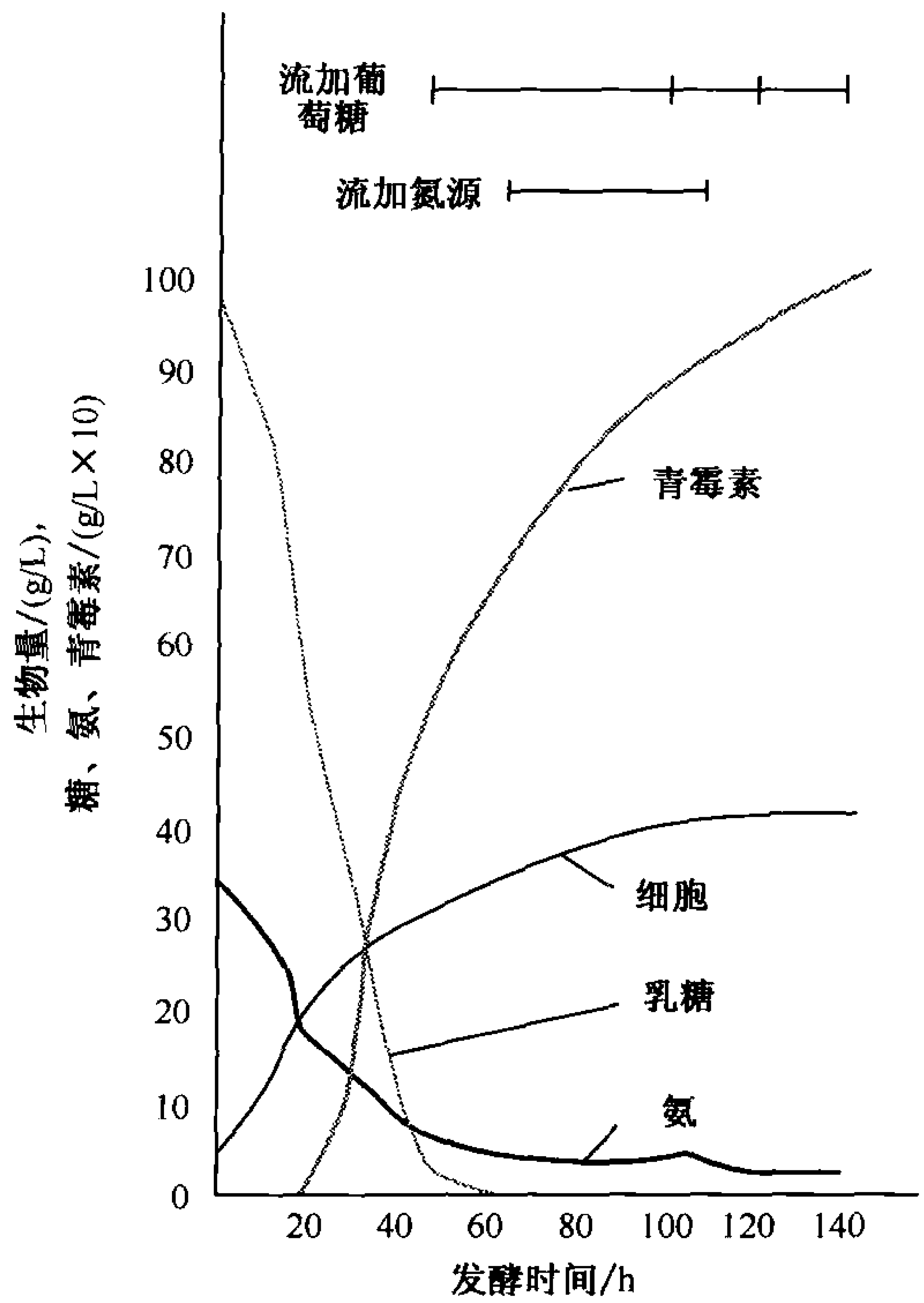


图 30.10　用产黄青霉进行青霉素发酵的动力学。注意当细胞进入稳定期，多数碳源和氮源耗尽后，青霉素是如何产生的。营养流加可保持高产青霉素。

其他 β-内酰胺抗生素

其他β-内酰胺抗生素包括头孢菌素（cephalosporin），该药物含有取代四氢噻唑环的二氢噻嗪环（第 20.8 节和图 20.12）。头孢菌素首先在真菌顶头孢（*Cephalosporium acremonium*）的产物中发现，但其他真菌及一些原核生物也产生具有这种环的抗生素。另外，许多类似于半合成青霉素的半合成头孢菌素也已生产（图 30.9）。头孢菌素在临床上的价值不仅因为它们毒性低，而且还因为它们是广谱抗生素（broad-spectrum antibiotic）（见 20.8 节），用于抵抗广泛的各种细菌病原体。

四环素的生产

四环素（tetracycline）的生物合成包含一系列的酶促反应步骤。例如，金霉素（chlortetracycline）（图 30.11）就包含 72 种中间产物，而其中大部分我们只是一般了解；对金霉素链霉菌（*Streptomyces aureofaciens*），即金霉素产生菌的遗传学研究表明，300 多个基因参与这个过程！

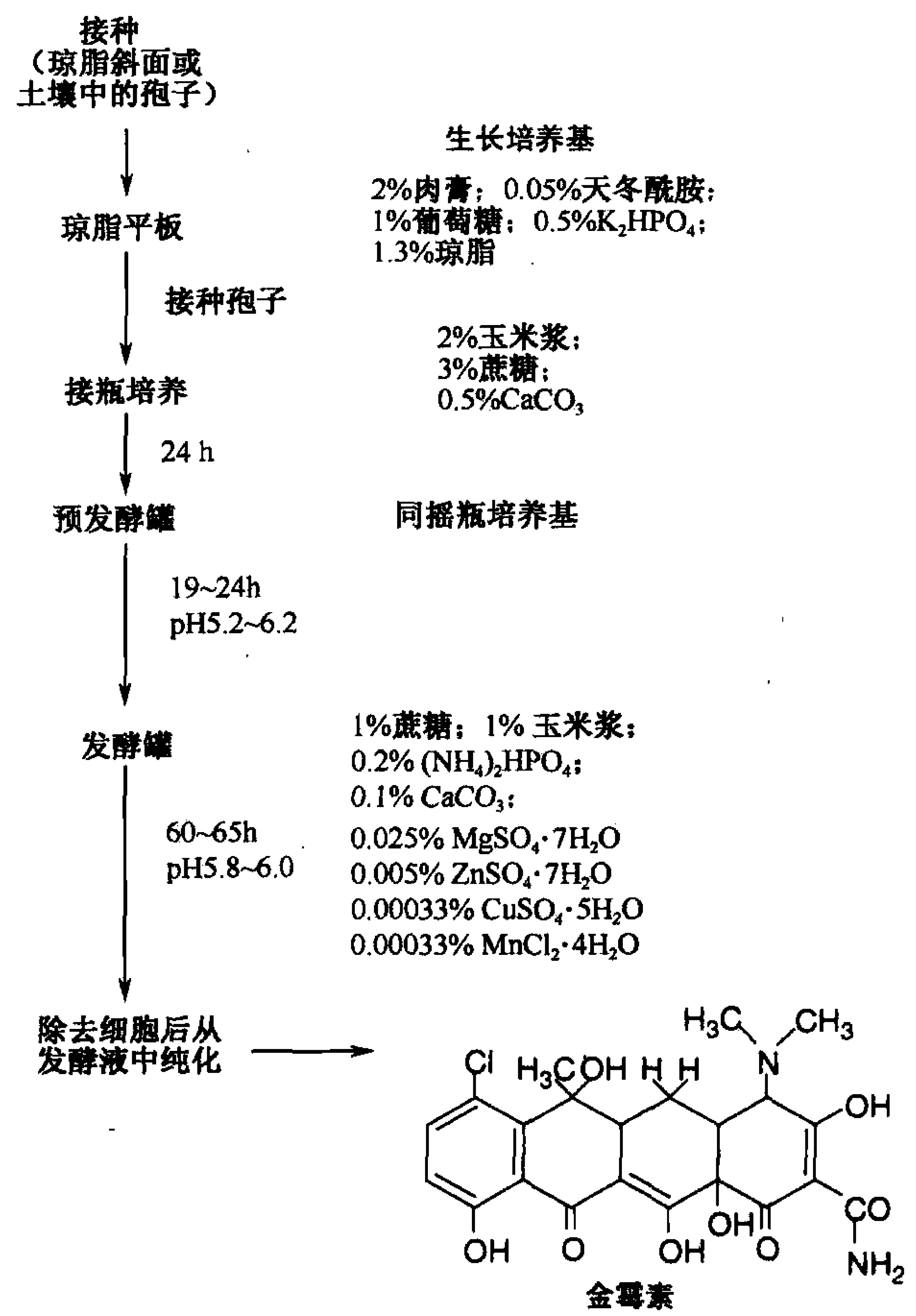


图 30.11 金霉素链霉菌生产金霉素的示意图。金霉素的结构见右下图。生长温度始终是 28℃。

如此大的基因数目，使得该抗生素的生物合成调控机制十分复杂，目前已经知道了几种调控信号，并制定了相应的生产计划。例如，葡萄糖和磷酸盐抑制金霉素的合成，其中磷酸盐的抑制作用特别显著，所以在工业生产中所使用的培养基中的磷酸盐浓度很低。图 30.11 显示了金霉素生产过程，正如青霉素生产，玉米浆应用于大规模生产金霉素，但蔗糖（不是乳糖）是典型碳源，避开使用葡萄糖是因为在四环素发酵中它可引起抗生素生产过程中分解代谢物阻抑（见 8.7 节）。

概念检查

具有临床意义的主要抗生素，包括β-内酰胺抗生素青霉素和头孢霉素以及四环素类抗生素。所有这些抗生素都是典型的次生代谢物，尽管对它们生物合成的生化和遗传机制还有待于了解，但目前其工业化生产是可以顺利进行的。

◆ 青霉素和头孢霉素共同的化学结构是什么？

◆ 在青霉素生产中，半合成及生物合成各是什么意思？

30.7 维生素和氨基酸

维生素和氨基酸是生长因子，常被应用于药物或添加到食品中，几种重要的维生素和氨基酸的工业化生产是通过生物催化过程来完成的。

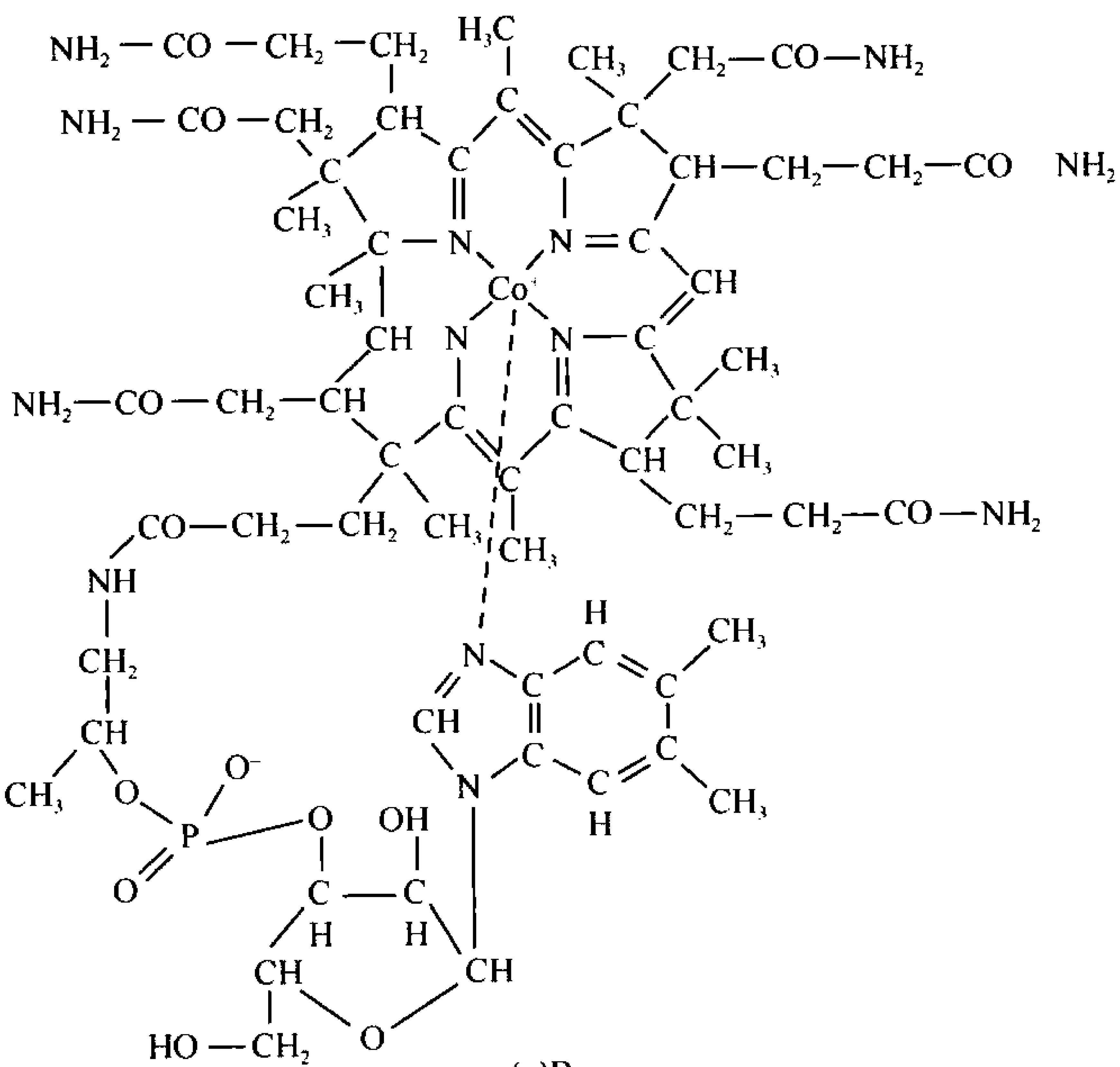
维生素

维生素可作为人类食品和动物饲料的添加剂，在药物的销量排行中，维生素的生产仅次于抗生素而位居第二位。多数维生素的商业化生产是由化学合成的，但一些维生素，由于其生产工艺太复杂，以至于无法以较低的成本合成，但它们却可以通过生物催化的方法来生产，维生素 B_{12} 和核黄素是这类重要的维生素。

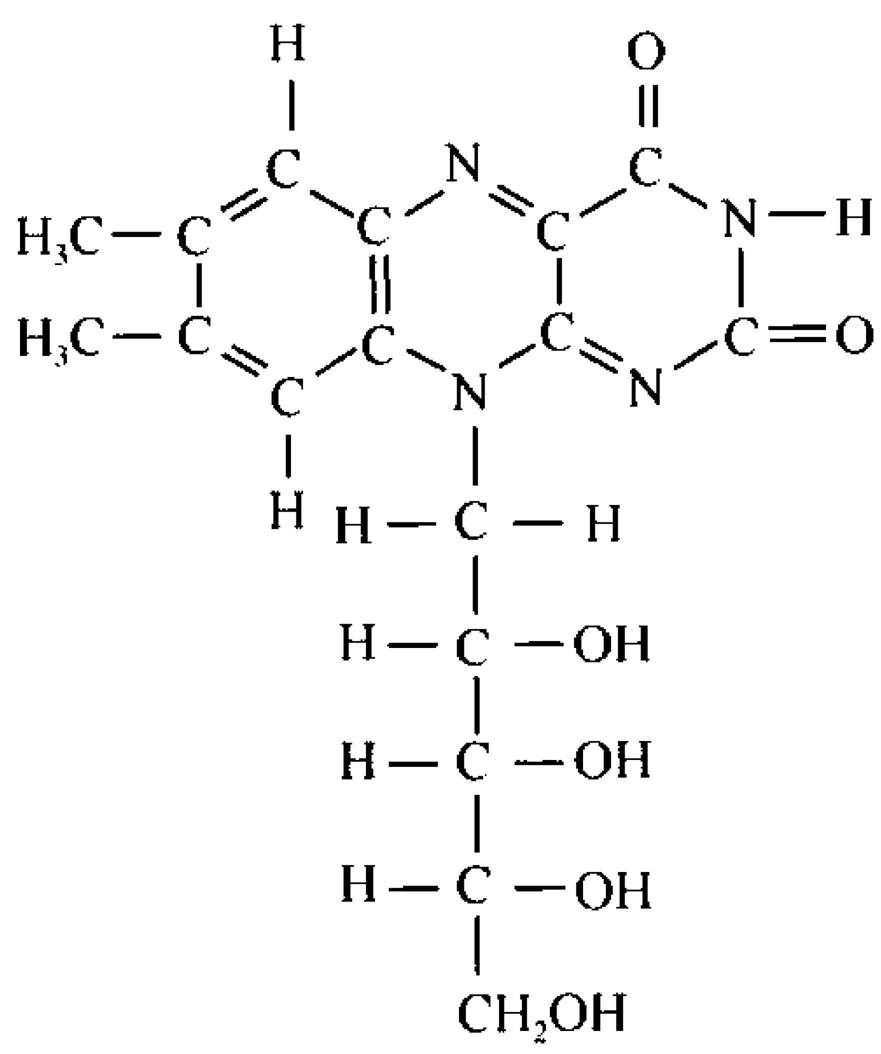
自然界中的维生素 B_{12}（vitamin B_{12}）（图 30.12a）不是由微生物合成的，作为一种辅酶，维生素 B_{12} 在动物生化过程中的各种分子内重排起重要作用，所谓分子重排是指一个碳原子上的氢与相邻碳原子上的取代基团的互换。人体中若严重缺乏维生素 B_{12}，将引发恶性贫血，该病的临床症状是红细胞减少和神经系统紊乱。动物对维生素 B_{12} 的需求量是通过食物摄取或吸收由寄生于肠道内微生物合成的维生素来满足的，植物既不能产生也不能利用维生素 B_{12}。

已经筛选出具有高产维生素的微生物菌株应用于维生素 B_{12} 的工业生产，丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）是主要的工业生产菌。发现在维生素 B_{12} 中有金属钴（图 30.12a），在培养基中加入少量钴可以大大提高维生素 B_{12} 的产量。

核黄素（riboflavin）（图 30.12b）是黄素 FAD 和 FMN 的合成前体，而后二者作为辅酶在所有生物体的氧化还原酶系中起重要作用（见 5.11 节）。许多种微生物都能合成核黄素，包括细菌、酵母菌和真菌。真菌棉阿舒囊霉（*Ashbya gossypii*）可天然产生大量的核黄素（高达 7g/L），因此作为主要种类而应用于微生物生产过程中。尽管微



(a)B_{12}



(b) 核黄素

图 30.12 由微生物工业化规模生产维生素。（a）维生素 B_{12} 的结构，注意中心的钴原子，形成维生素 B_{12} 的辅酶含有一个脱氧腺苷基团附在环平面的 Co 原子上。（b）核黄素（维生素 B_2；见 5.11 节和图 5.15）。

生物产量很高，但微生物生产和严格的化学合成间仍存在激烈的经济竞争。

氨基酸

氨基酸作为食品添加剂在食品工业、医学领域，以及作为原料在化学工业中都有广泛应用（表 30.3）。最重要的商业氨基酸是谷氨酸（glutamic acid），作为一种增味剂［谷氨酸单钠（MSG）］，另外两种重要的氨基酸——天冬氨酸（aspartic acid）和苯丙氨酸（phenylalanine）是人造增甜剂天冬苯丙二肽酯的成分，后者是作为低热量或无糖产品的软饮料和其他食品的一种非营养增甜剂，天冬苯丙二肽酯（aspartame）是天冬氨酰和苯丙氨酸甲酯形成的二肽。赖氨酸（lysine）是人体和一些畜禽的必需氨基酸，工

业上作为食品添加剂是由黄色短杆菌（*Brevibacterium flavum*）产生的，这里我们主要讲述它的生产。

表 30.3　食品工业中用到的氨基酸[a]

氨基酸[b]	每年世界产量/立方吨	用途	目的
L-谷氨酸(谷氨酸单钠,MSG)	370 000	各种食品	增味剂,嫩肉剂
L-天冬氨酸和丙氨酸	5000	果汁	
甘氨酸	6000	甜味食品	增加风味,有机合成的起点
L-胱氨酸	700	面包,果汁	提高质量,抗氧化
L-酪氨酸＋L-组氨酸	400	各种食品,固体牛奶	抗氧化,防止酸败;营养添加剂
天冬苯丙二肽酯(从 L-苯丙氨酸和 L-天冬氨酸形成)	7000	软饮料,口香糖,许多其他无糖产品	低热量甜食
L-赖氨酸	70 000	面包(日本),食品添加剂	营养添加剂
DL-甲硫氨酸	70 000	豆制品,食品添加剂	营养添加剂

a. 数据摘自 Glazer A N，Micaido H，1995. *Microbial Biotechnology*，Freeman W H，New York.

b. 这些氨基酸的结构如图 3. 12 所示。

因为氨基酸是微生物用于合成酶和其他蛋白质的原料，所以它们的合成是严格的细胞调控（第 8 章）。然而在氨基酸的工业生产中，必须避开这些调控机制，以期获得一株超产菌株，达到工业生产氨基酸的目的。

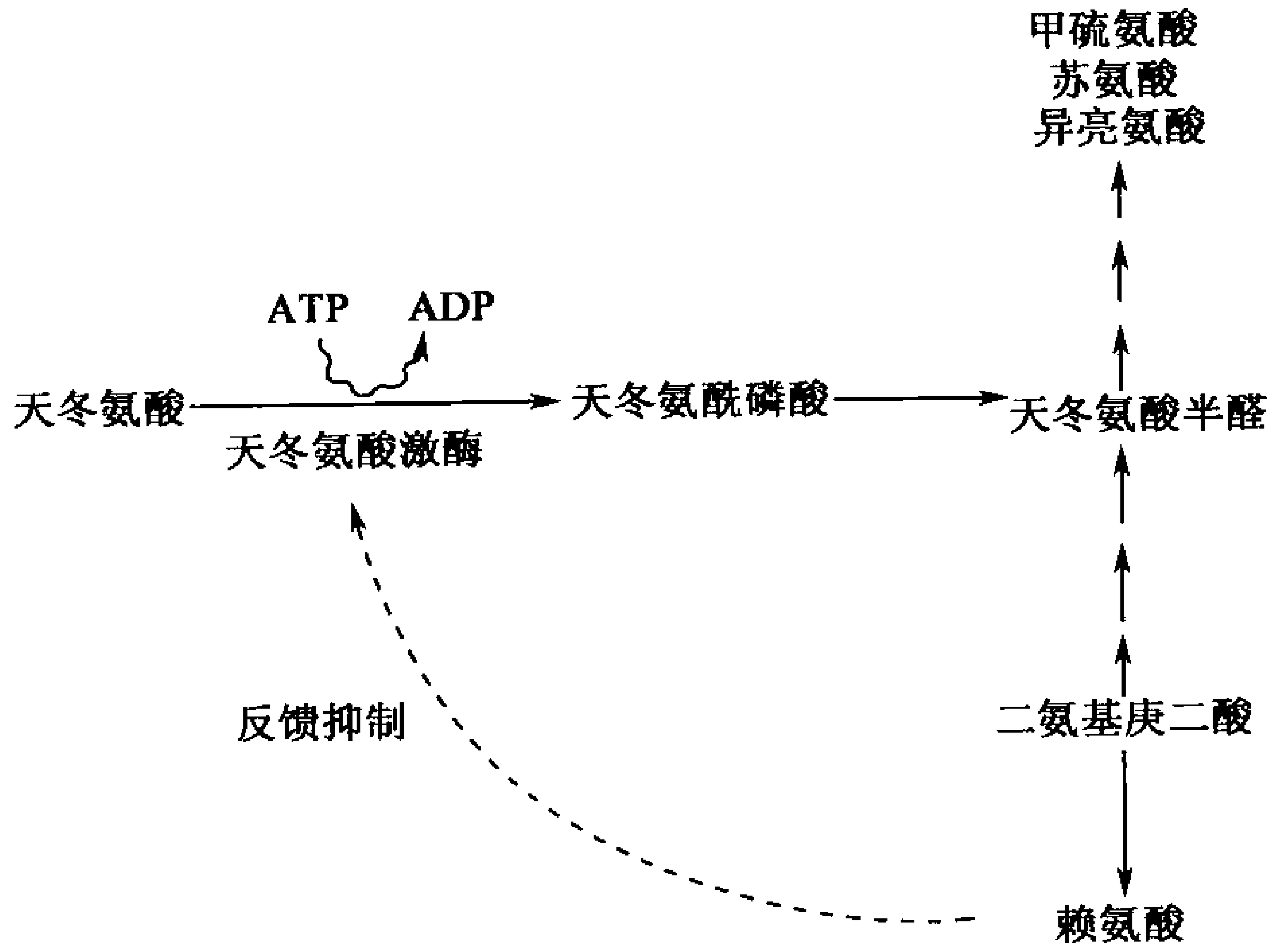
在黄色短杆菌生产赖氨酸的过程中，对其生化控制是通过过剩的赖氨酸反馈抑制天冬氨酸激酶来实现的（图 30. 13a）（反馈抑制的一般情形在 8. 2 节中做了介绍）。通过分离天冬氨酸激酶不受反馈抑制的黄色短杆菌突变株，就可以获得高产的赖氨酸。S-氨乙基半胱氨酸（AEC）作为赖氨酸的类似物，可以结合于天冬氨酸激酶的变构部位而使该酶失活（图 30. 13b），通过正向选择可以很容易获得 AEC 抗性突变株。这些突变株产生一种修饰形式的天冬氨酸激酶，该酶的变构部位不能识别 AEC 或赖氨酸，因此赖氨酸反馈抑制作用大大降低，这种黄色短杆菌突变株在工业发酵罐中赖氨酸产量可达 60g/L，如此足够高的浓度使得赖氨酸工业生产可行。

概念检查

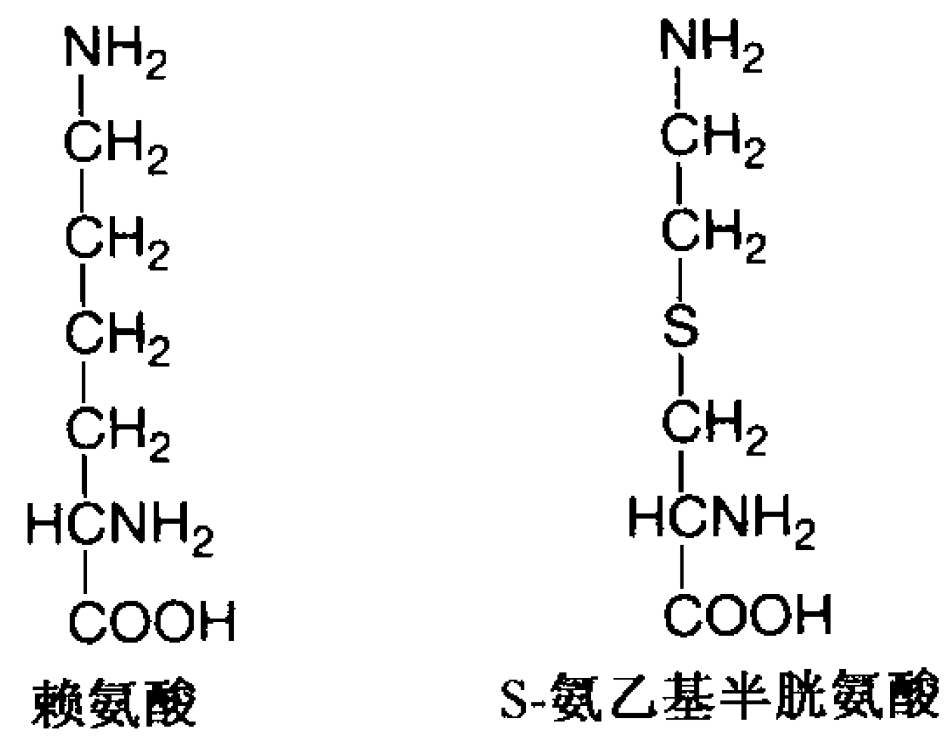
微生物法产生的维生素包括维生素 B_{12}和核黄素，工业生产的最重要氨基酸是谷氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸。高产氨基酸是通过修饰控制特定氨基酸合成的调节信号而获得的。

◆ 工业生产中，产量最大的是什么氨基酸？

◆ 如何克服反馈抑制以提高氨基酸产量？



(a)



(b)

图 30.13　黄色短杆菌（*Brevibacterium flavum*）工业生产赖氨酸。（a）从天冬氨酸到赖氨酸的生物化学途径；注意赖氨酸可以反馈抑制天冬氨酸激酶的活性，导致赖氨酸生产的停止。（b）赖氨酸和赖氨酸类似物 S-氨乙基半胱氨酸（AEC）的结构。AEC 通常抑制生长，但黄色短杆菌 AEC 抗性突变株在它们的天冬氨酸激酶处有一个改变的变构部位，由于反馈抑制的去除使得菌体能够生长并产生过量的赖氨酸。

30.8　类固醇和生物转化过程

我们在 4.5 节中讨论了真核生物细胞膜中固醇的作用。类固醇（steroid）是固醇的衍生物，是重要的动物激素，调节许多代谢过程。一些类固醇也可用于人类医学的药物，其中的一类皮质类固醇（corticosteroid），能够减轻炎症，因而这些复合物是控制关节炎和过敏反应症状有效的治疗剂。另一类雌激素（estrogen）和雄性类固醇（androgenic steroid），在人生育力方面起着作用，其中的一些在治疗上可用于控制生育或作为刺激剂增强肌肉力量。

类固醇可以通过完全的化学方法合成，但这是一个复杂而昂贵的过程，化学合成中的一些关键步骤可以通过微生物更高效地完成，因此，类固醇的工业生产中至少有一步由微生物完成。工业上多数类固醇的生产是由生物转化（biotransformation）过程来完成的，此过程涉及微生物在大型发酵罐中的生长，然后在适当的时间加入固醇前体，后

者是从廉价的起始原料中获得的，典型的是豆固醇（stigmasterol），一种大豆工业的副产物，接着是一个培养期，此时固醇前体被生物转化，最后提取发酵液并纯化固醇（图 30.14）。

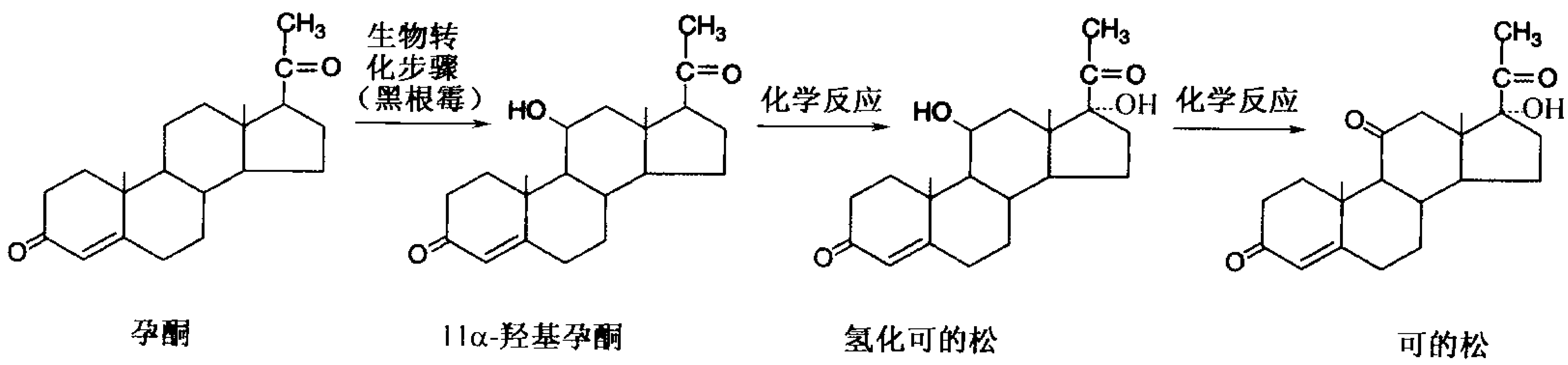


图 30.14　利用微生物生产可的松：一个生物转化的例子。 可的松生产的第一步反应是一个典型的微生物生物转化，从孕酮形成 11α-羟基孕酮，这步高特异（和立体特异的）的氧化反应由真菌黑根霉完成，绕过了一个困难的化学合成。从 11α-羟基孕酮到类固醇激素可的松的所有的其他步骤都是由化学方法完成的。

可的松和氢化可的松

氢化可的松（hydrocortisone）和可的松（cortisone）这类皮质类固醇可以减轻轻微皮肤刺激所引起的肿胀和瘙痒，在其生产中，真菌黑根霉（*Rhizopus nigricans*）可完成关键的生物转化，即对可的松前体的立体特异性进行羟化作用（图 30.14）。大多数类固醇的生物转化均包括这种类型的羟化作用，工业上应用各种不同的真菌在类固醇分子的特异位点完成立体特异性羟化作用。

尽管多数生物转化不如有机化学能力强，但微生物完成反应更经济。四种主要类固醇——氢化可的松、可的松、强的松（prednisone）和脱氢皮质甾醇（prednisolone）的世界销售量每年超过 800t，因此类固醇生产是目前一个大的商业类型。

概念检查

微生物的生物转化是利用微生物生物催化特殊的步骤或者对化学合成受限制的步骤进行生物转化。

- 请举出一个微生物生物转化的实例，为什么这个生物转化是必需的？
- 描述生物转化不同于典型发酵的两种方法，如抗生素的生产。

30.9　作为工业产品的酶

每种生物体都产生各种各样的酶，大多数仅以小量产生，并参与细胞过程（见 5.5 节），然而一些生物体可产生大量的特异性酶，这些酶并不在细胞内部，而是分泌到培养基中。这些细胞外酶称为胞外酶（exoenzyme），能够消化不溶性多聚物，如纤维素、蛋白质和淀粉，消化后的产物运输到细胞中作为营养供菌体生长。

酶是特别有用的生物催化剂，因为它们典型地作用于单个化学功能基团，可以辨别同一分子上相似的化学基团，而且，在许多情况下（如刚讨论的类固醇），它们催化的反应具有立体专一性，即只产生两种对映异构体中的一种（见 3.6 节）。许多酶应用于食品和医疗卫生产业，主要作为饮食添加物，而许多其他的酶用于洗衣行业和纺织工业（表 30.4）。现在我们简单地讨论它们的生产和应用。

表 30.4 微生物酶及其应用

酶	来源	应用	工业
淀粉酶(消化淀粉)	真菌	面包	焙烤
	细菌	淀粉包被	纸张
	真菌	糖浆及葡萄糖生产	食品
	细菌	冷胀洗衣淀粉	淀粉
	真菌	助消化	药剂
	细菌	脱浆工艺	纺织
	细菌	去污;去污剂	洗衣
蛋白酶(消化蛋白)	真菌	面包	焙烤
	细菌	去污渍	干洗
	细菌	使肉嫩化	肉
	细菌	清洁伤口	医学
	细菌	脱浆工艺	纺织
	细菌	家用去污剂	洗衣
蔗糖酶(消化蔗糖)	酵母	软心糖	糖
葡萄糖氧化酶	真菌	脱葡萄糖,脱氧	食品
		糖尿病试纸	药剂
葡萄糖异构酶	细菌	高果糖玉米糖浆	软饮料
果胶酶	真菌	榨汁,澄清	果酒,果汁
凝乳酶	真菌	凝固牛奶	奶酪
纤维素酶	细菌	软化,增亮纤维,去污剂	洗衣
脂酶	真菌	脱脂	制酪业,洗衣
乳糖酶	真菌	降解乳糖为葡萄糖和半乳糖	制酪业,保健食品
DNA 聚合酶	细菌	PCR 技术中的 DNA 复制(见 7.9 节)	生物研究;法医学
	古生菌		

蛋白酶、淀粉酶和高果糖浆

酶可以由细菌和真菌进行工业化生产，微生物工业化酶生产中产量最大的是细菌的蛋白酶，它作为洗衣粉的添加成分，目前大多数洗衣粉含有的酶主要是蛋白酶（protease），同时还包括淀粉酶（amylase）、脂肪酶（lipase）、还原酶（reductase）和其他一些酶类。这些酶大多数是从嗜碱细菌中分离出来的（见 6.13 节），主要是芽孢杆菌属的

种如地衣形芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）（表 30.4），这些酶的最适 pH 为 9～10，在碱性洗衣粉溶液中具有活性。

其他重要的工业化生产酶是淀粉酶和葡萄糖淀粉酶（glucoamylase），用于以淀粉为原料生产葡萄糖。然后生产出的葡萄糖可以在葡萄糖异构酶（glucose isomerase）的作用下，转化产生果糖（其甜度约是葡萄糖的 2 倍），最终实现以玉米、小麦、马铃薯淀粉为原料生产高果糖浆（high-fructose syrup）。高果糖浆具有很大的经济价值，因为它们的主要市场是在软饮料的生产方面，世界高果糖浆的生产接近每年 100 亿千克。

极端酶：酶来自于极端环境生存的原核生物

我们在第 2 章和第 6 章讨论了高温条件下的微生物生长情况，并发现称为超嗜热菌（hyperthermophile）的一些原核生物适合生长在非常高的温度下，超嗜热菌之所以能在如此高温下生长，是因为它们产生包括酶（见图 30.15b）在内的热稳定大分子（见 6.10 节和 6.12 节）。之所以称之为极端酶（extremozyme），是由于这些酶在一些极端环境中具有功能，如高温或强酸（图 30.15）。产生极端酶的生物称为嗜极端生物（extremophile）。

因为许多工业生产过程在高温下进行，所以极端酶广泛应用于工业生产和科学研究中。除 7.9 节所描述的应用于聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）的 *Taq* DNA 聚合酶和 *Pfu* DNA 聚合酶外，已经从各种不同的超嗜热菌中分离并鉴定了一批极端热稳定蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶（cellulase）、支链淀粉酶（pullulanase）（图 30.15b）和木聚糖酶（xylanase）。但市场上不仅只有热稳定酶，还发现了一些具有低温活性的（从嗜冷菌中分离）、在高盐环境中具有活性的（从嗜盐菌中分离）或者在强酸或强碱下具有活性的（分别从嗜碱菌和嗜酸菌中分离）（图 30.15a）极端酶，一些已经商品化。酶的高度特异性和它们所具有的识别手性异构体的能力使得那些在极端环境下具有功能的极端酶具有各种不同的工业应用。

固定化酶

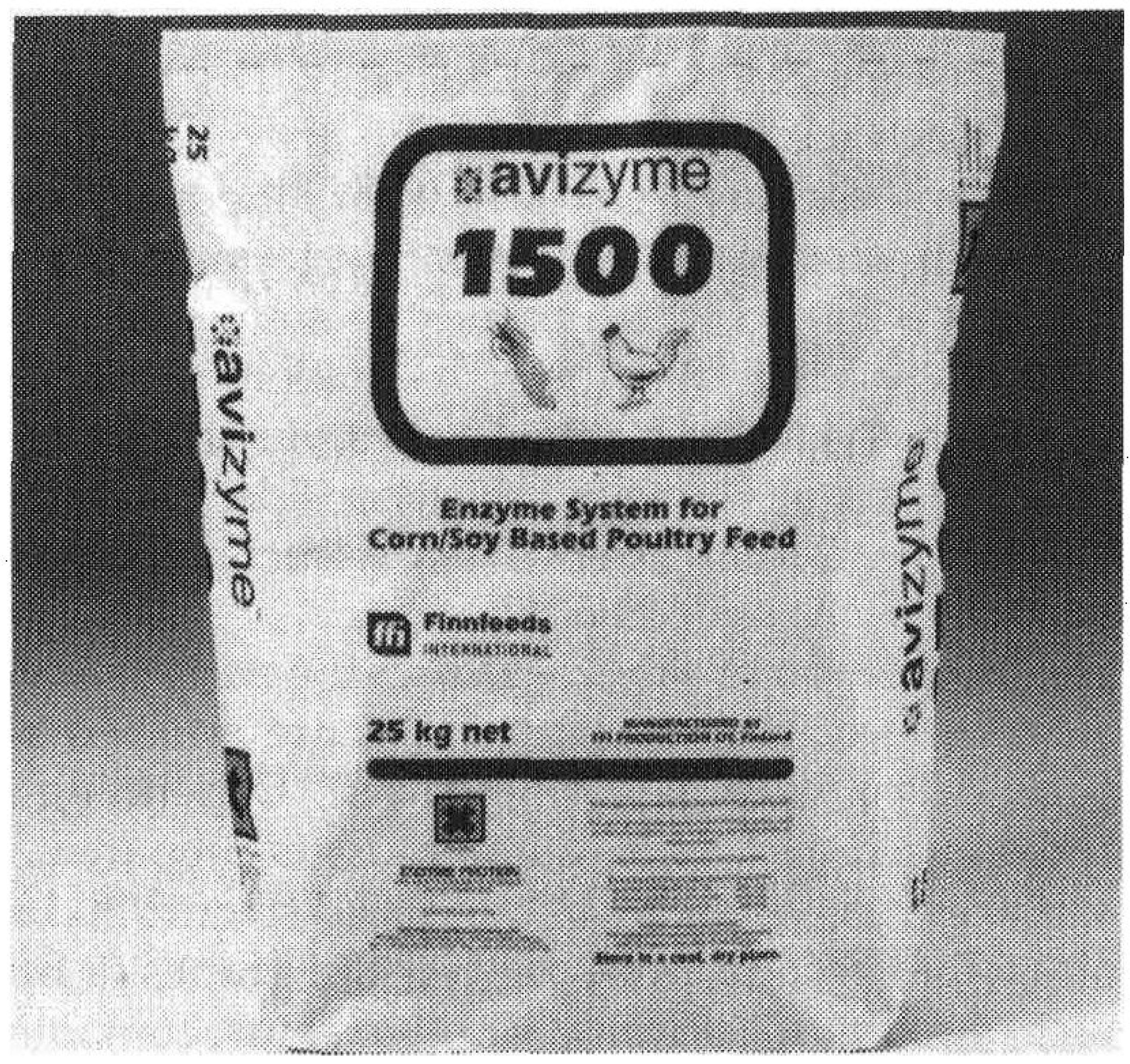
对于某些生物催化过程，需要将可溶性酶固定到一个固体表面，这些酶称为固定化酶（immobilized enzyme）。固定化不仅使酶在大规模连续条件下容易完成酶促反应，而且帮助稳定酶，避免发生变性。已经有许多不同的固定化酶应用在工业过程中，一个很好的例子是淀粉加工工业，正如以前所描述的，通过淀粉酶和葡萄糖异构酶连续处理淀粉可以转化成高果糖浆，葡萄糖到果糖部分转化约为 50%，但可以通过分离果糖和循环残留葡萄糖来提高转化率。

酶的固定化有三种基本方法（图 30.16）：

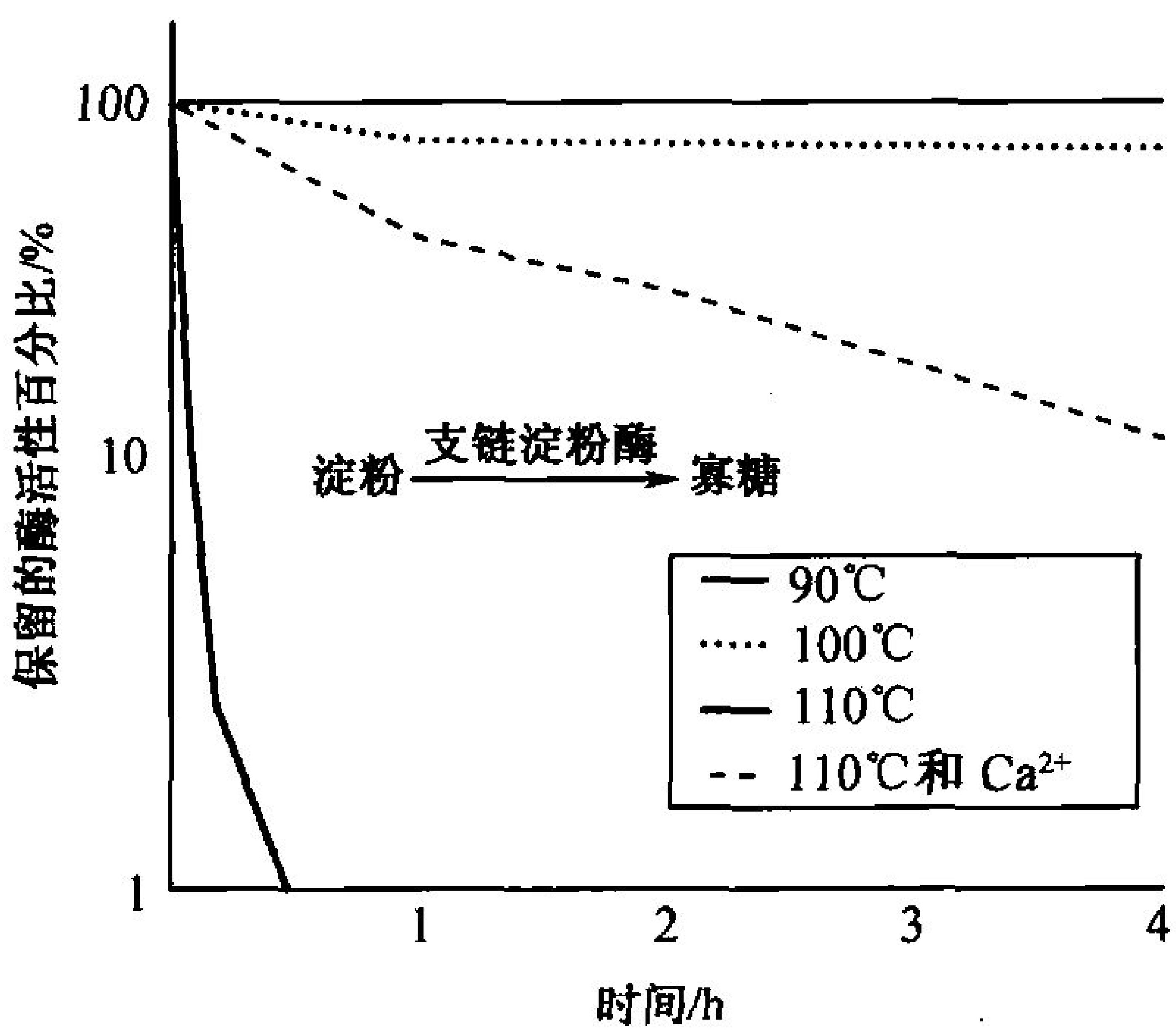
1. 酶和载体联结。这种联结可以通过吸附、离子键或共价键来实现，常用载体包括修饰的纤维素、活性炭、黏土矿质、氧化铝和玻璃珠（图 30.16）。

2. 酶分子的交联（聚合作用）。酶分子间的相互交联通常是由交联剂如戊二醛通过化学反应来完成的，酶的交联指酶蛋白的氨基酸基团同戊二醛的化学反应，醛也是变性剂，但是如果反应进行得合适，则交联后酶分子的大部分活性将会保留下来。

3. 酶的包埋，即将酶结合于半透膜中，酶可包埋于微胶囊、凝胶、聚合半透膜以



(a)



(b)

图 30.15 极端酶的例子，在极端环境条件下，酶具有功能。(a) 耐酸酶。酶混合物作为禽类饲料添加物，酶在鸟胃中的功能是消化饲料中的纤维物质，改进饲料的营养价值，促进鸟更快生长。(b) 热稳定酶。从沃氏火球菌（*Pyrococcus woesei*）分离的支链淀粉酶（pullulanase）的热稳定性，超嗜热菌最适生长温度是 100℃（见 13.6 节），钙可以提高该酶的热稳定性，但在 110℃时该酶也变性（见 3.8 节）。

及聚合纤维如醋酸纤维中（图 30.16）。

用于固定化酶的每一种方法都有优势和不足，使用的方法应视酶的种类、特定的工业应用和操作范围而定。

概念检查

微生物是理想的用于大规模生产酶的生物。许多酶类已应用于洗衣工业除去衣服的

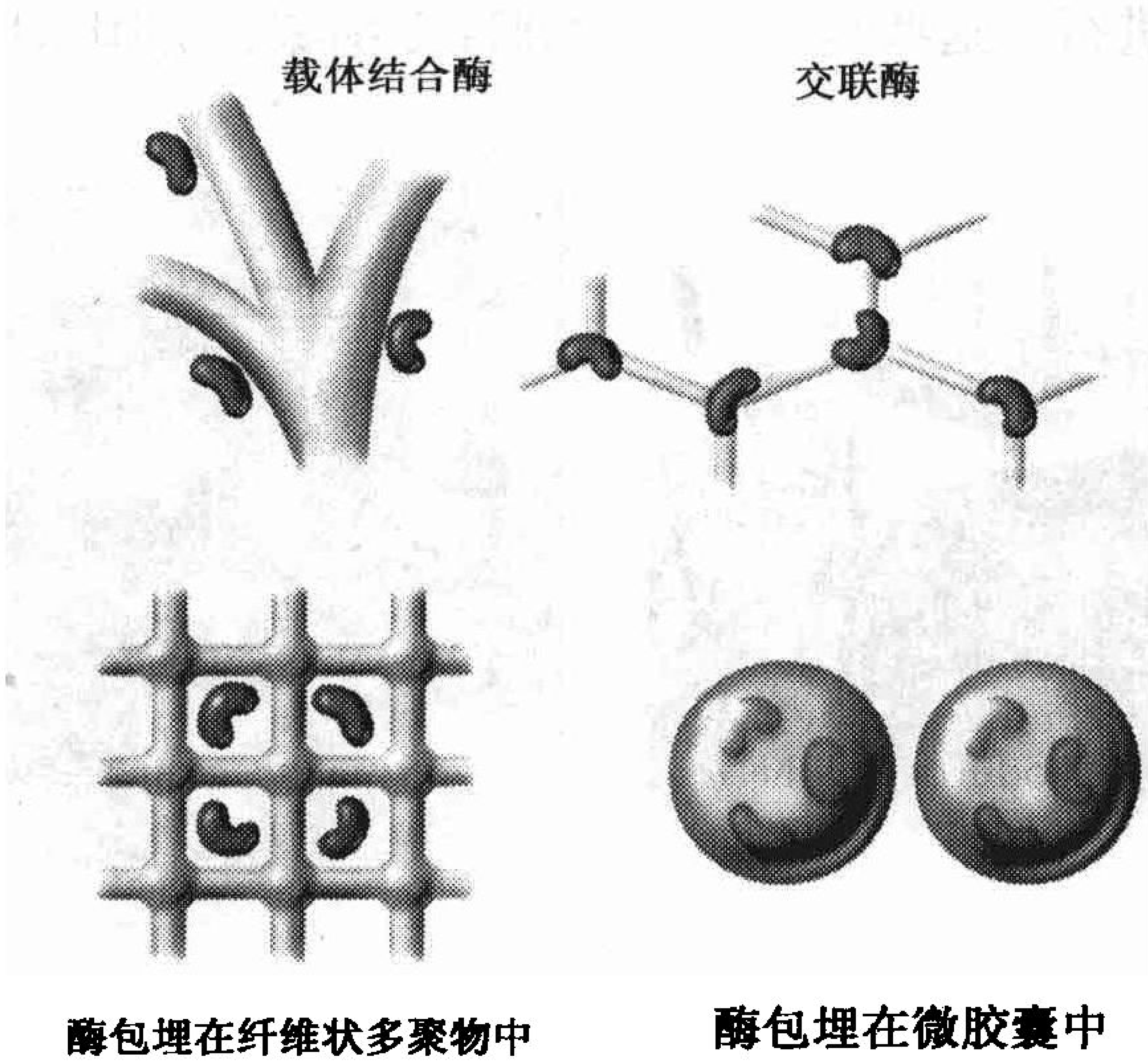


图 30.16　酶固定化的方法。所有方法中，酶分子为红色，使用的实际方法依酶种类、反应和范围而定。

污渍，而热稳定的和碱稳定的酶类在这一市场占有很大优势。来自嗜极菌的酶是在极端条件下生物催化所需的。当酶用于大规模工艺时，通常需要将其与一种非活性物质结合，使之固定。

◆ 酶是如何应用于洗衣工业的?

◆ 生产高果糖浆需要的关键酶是什么?

◆ 什么是极端酶?

Ⅲ　用于食品和饮料产业的主要工业产品

尽管工业微生物学作为一门学科可以追溯到抗生素时代，但抗生素只是工业范围的一类产品，正如我们已经看到的，许多食品和添加剂也是通过工业过程生产的。我们现在讨论一些其他的产品，从应用于饮料产业和作为工业溶剂的酒精的生产开始。

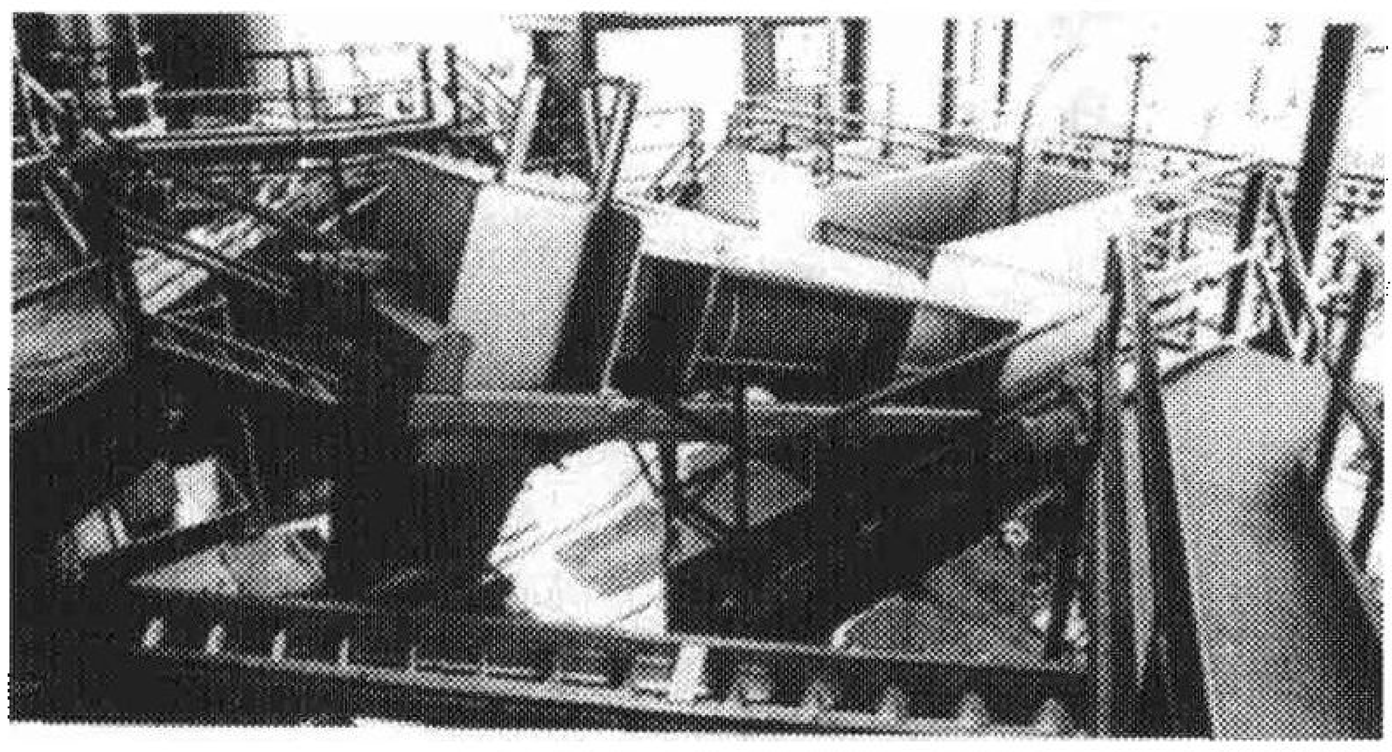
30.10　酒精和酒精饮料

大多数水果汁和谷物都可由存在于这些原料中的野生型酵母菌催化进行天然发酵，从这些天然发酵中，可以筛选到酵母菌种，以便更好地控制生产。现在酒精饮料的生产是世界范围内的一个巨大产业，最重要的酒精饮料是由葡萄汁发酵生产的葡萄酒(wine)，由粮食酿制的啤酒（beer）或浓啤酒（ale）和浓缩酒精发酵液生产的蒸馏酒(distilled beverage)。由酵母菌进行的酒精发酵的生物化学已在 5.10 节中做了讨论。

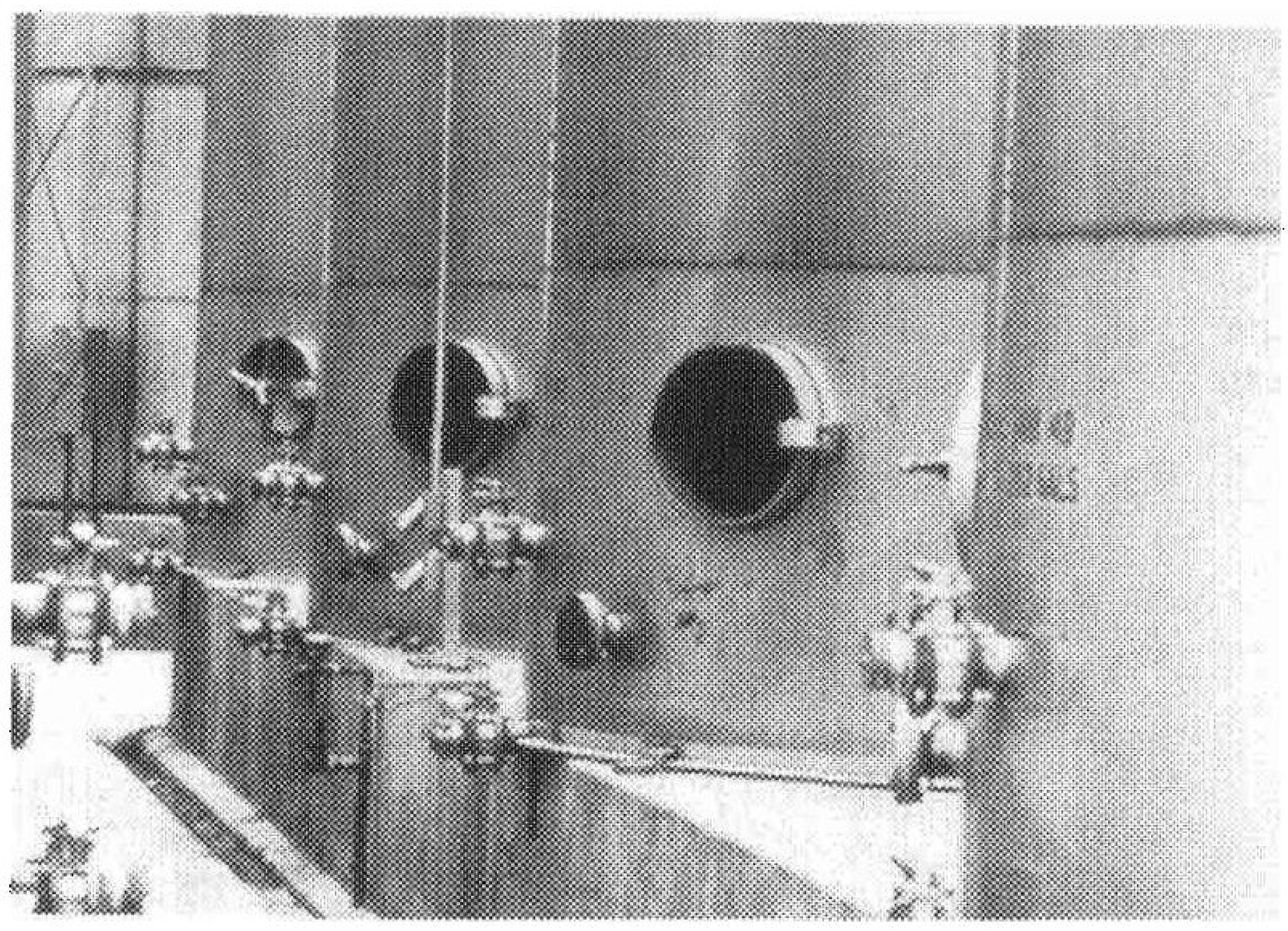
葡萄酒种类和生产

大多数果酒是由葡萄酿造的，因此葡萄酒酿造主要是在世界范围内能够大量生长高

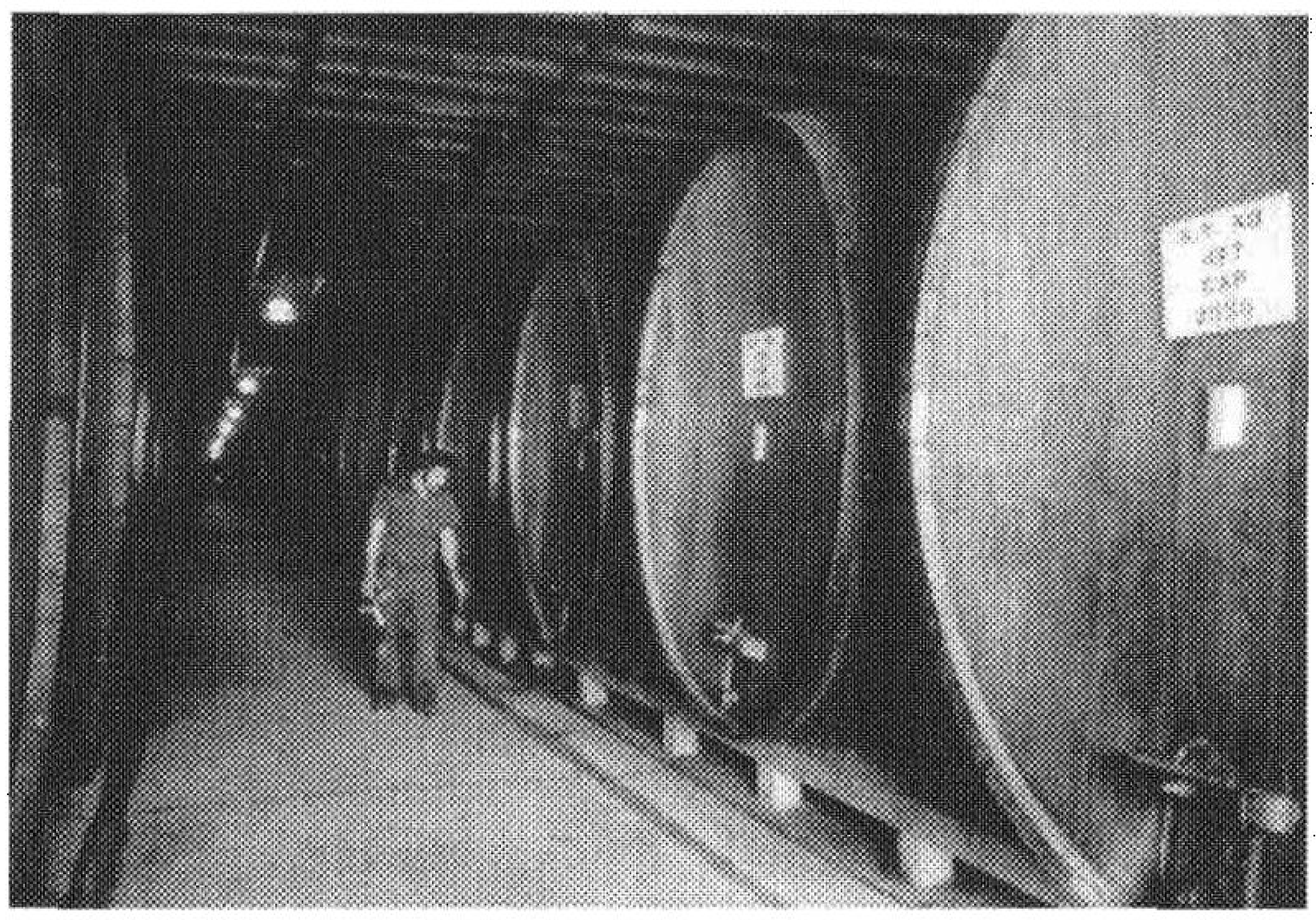
质量葡萄的部分地区进行，这些地方包括欧洲许多国家、美国（图 30.17）、新西兰、澳大利亚和南非。



(a)



(b)



(c)

图 30.17 加利福尼亚（美国）工业葡萄酒的酿造。(a) 将葡萄制成酿酒原料的设备。(b) 葡萄酒发酵的主要生产大罐。(c) 陈酿酒用的大桶，木制桶储存某些红葡萄酒可以持续几年。

葡萄酒种类很多，具有不同的风格和特点。干白葡萄酒（dry wine）是将果汁中的糖全部转化，而甜葡萄酒（sweet wine）是在发酵产品中剩余一些糖或发酵后补加糖。加度葡萄酒（fortified wine）是发酵后加入白兰地或其他烈性酒，雪莉酒（sherry）和波特酒（port）是最有名的加度葡萄酒。泡沫酒（sparkling wine）如香槟酒是一种含有大量 CO_2 的酒，它是由酵母菌直接在密封的瓶子中最终发酵产生的。

葡萄酒的生产开始于葡萄丰收的初秋时节。将葡萄捣碎，挤出的果汁称为葡萄汁（must)。根据采用的葡萄种类和果汁的制备方法不同，可生产出白葡萄酒和红葡萄酒（图 30.18)。白葡萄酒或是由白葡萄直接酿造，或是由红葡萄汁酿造的，但其含有红色素的皮已被去掉。红葡萄酒酿造过程中，果渣（pomace)（即果皮、种子、茎）在发酵中都保留。除了颜色不同外，红葡萄酒比白葡萄酒味道更浓，主要由于酿造过程中，红葡萄果皮中大量的单宁（tannin）也进入到果汁中。

参与葡萄酒发酵的酵母菌有两种类型：一种是野生型酵母菌（wild yeast)，存在于收获的葡萄中，然后转入到果汁中；另一种是培养的葡萄酒酵母菌（cultivated wine yeast)，如椭圆酵母（*Saccharomyces ellipsoideus*)，把它加入到果汁中使发酵开始。

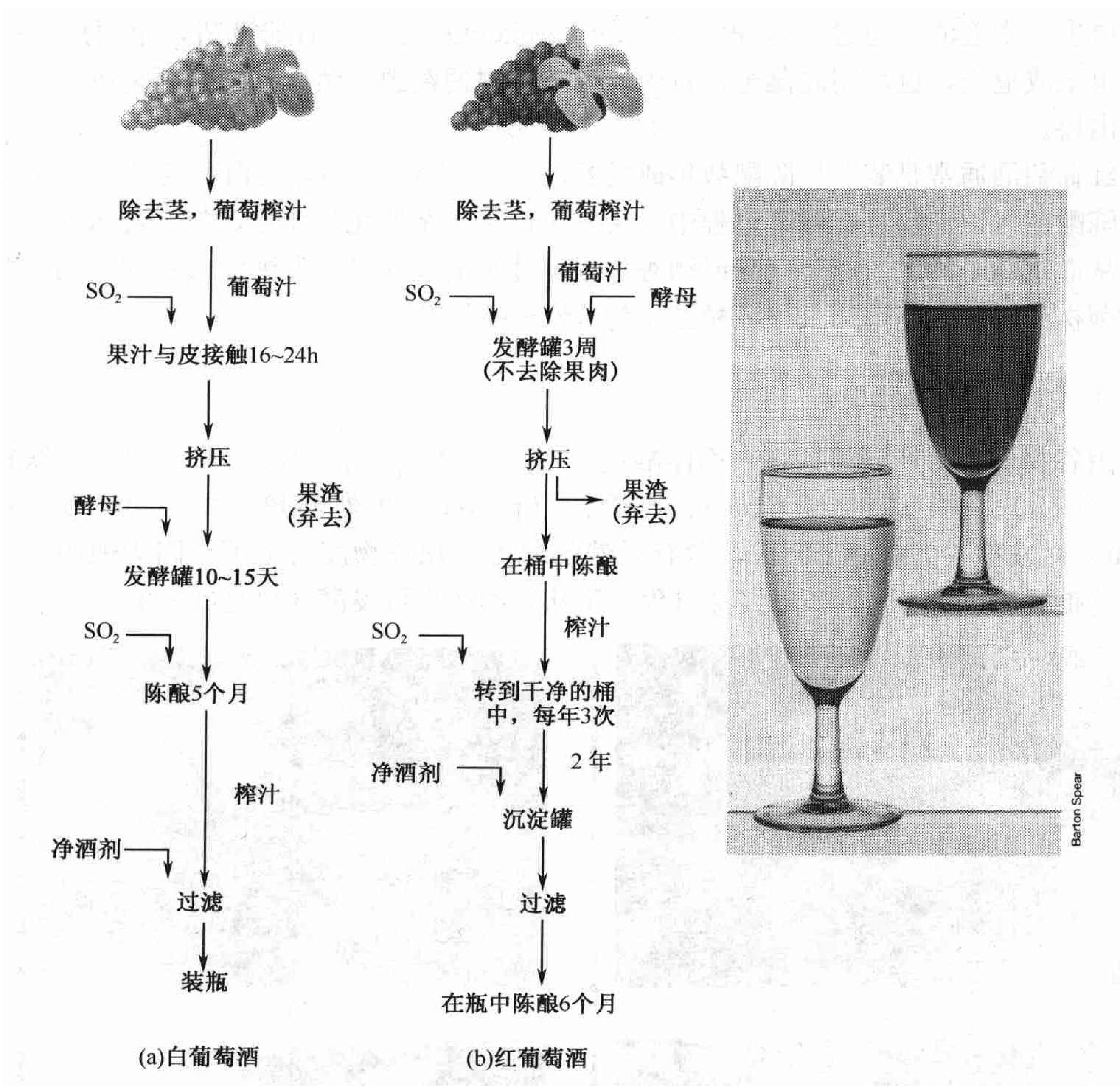


图 30.18　葡萄酒的生产。(a) 白葡萄酒，根据所用葡萄的不同，白葡萄酒的颜色从无色到草莓色。(b) 红葡萄酒，其颜色从浅红到深红。照片中显示的是一杯白诗南 (chenin blanc)，典型的白葡萄酒 (左) 和一杯浅色红葡萄酒 (玫瑰红，右)。其他各种典型的白葡萄酒包括夏布利 (chablis)、莱茵酒 (Rhine wine)、索坦 (sauterne)、霞多丽 (chardonnay)，而其他各种典型的红葡萄酒包括勃根地 (burgundy)、奇安帝 (chianti)、波尔多 (claret)、金粉黛尔 (zinfandel)、赤霞珠 (cabernet)、梅洛 (merlot)。

野生型酵母菌比工业葡萄酒酵母菌酒精耐受性低，并且产生一些化合物影响最终产品的质量。因此，在生产中，许多酿酒厂为杀死葡萄汁中的野生型酵母菌通常加入 100μg/g 的 SO_2 (瓶子标签上写着硫化物)。椭圆酵母可以抵抗该浓度的 SO_2，因此，将纯培养生长的椭圆酵母作为起始培养物添加到灭菌的葡萄汁中。发酵能在各种型号的发酵器中进行，从 200L 的桶到 200 000L 的大罐，这些可以是用栎树木、水泥、石头或玻璃材料制成 (图 30.17b)。制造发酵罐必须保证发酵过程中产生的大量 CO_2 能被排出而空气不能进入，这主要是通过安装在容器上的一个特殊单向活塞阀实现的。

红葡萄酒发酵 3～5 天后，足够的单宁和颜色从果渣中浸出，葡萄酒转入到一个新罐中，进行 1～2 周的进一步发酵。下一个步骤称为榨汁 (racking)，将葡萄酒从沉淀中分离出来，沉淀主要含有酵母菌和沉淀物，然后在低温下陈酿数年，以提高它的风

味，再进一步澄清，通过加入净酒剂（fining agent）促进最后的澄清，净酒剂如酪蛋白、单宁或皂土，也可用硅藻土、石棉或滤膜过滤葡萄酒。然后，葡萄酒装瓶，继续陈酿或出售。

红葡萄酒通常是装瓶后陈酿数年或更长时间（图 30.17c），而白葡萄酒一般不需长时间陈酿就可以出售。在陈酿过程中，会发生许多复杂的化学变化，包括苦味成分的减少，从而提高了酒的口味和气味或酒香。根据葡萄的糖含量、发酵的长短和使用葡萄酒酵母菌株的不同，葡萄酒最终酒精浓度为 6%～15%。

酿造：制备麦芽汁

由谷物麦芽生产酒精饮料，称作酿造（brewing）（图 30.19）。典型的麦芽饮料有啤酒（beer）、淡色浓啤酒（ale）、黑啤酒（porter）和烈性黑啤酒（stout）。麦芽（malt）由发芽的大麦种子制成，含有天然的酶可消化谷物淀粉为糖。因为酿酒酵母不能消化淀粉（图 3.6b），所以发芽过程对于从谷物产生可发酵底物是必需的。

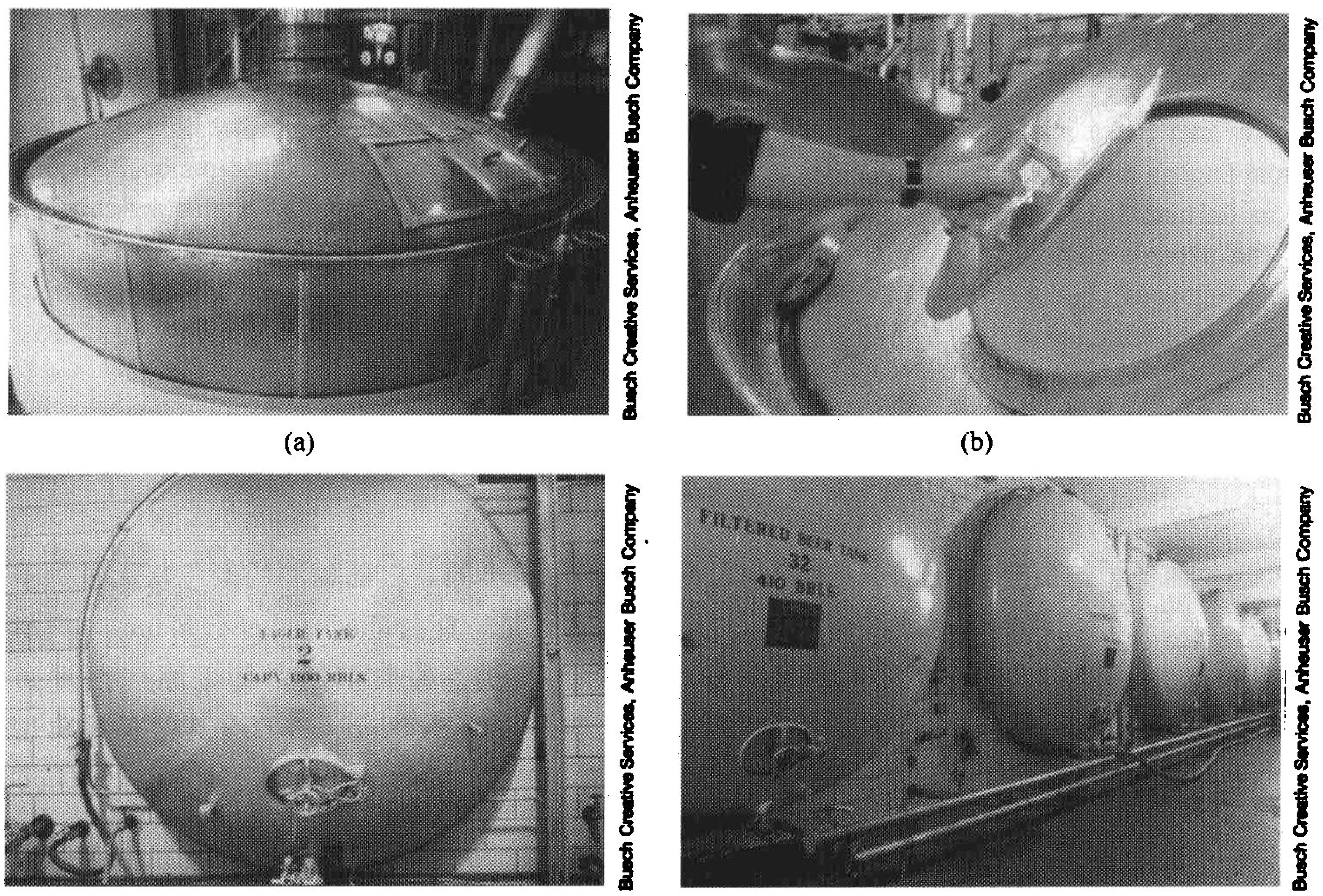


图 30.19　工业酿造厂酿造啤酒。（a，b）麦芽汁和啤酒花混合并加热时用的铜器，发酵液从大铜器进入到大发酵罐中，酵母菌发酵葡萄糖为乙醇和 CO_2。（c）如果是储存啤酒，则啤酒连同颗粒物如酵母细胞储存在大罐中低温保存几周。（d）接着过滤啤酒，再放入储存罐中，准备装入小桶、瓶或铁罐中。

啤酒和浓啤酒发酵液的制备过程称为淀粉糖化（mashing）。糖化醪液的谷物可只由麦芽组成，也可加入玉米、大米、小麦等。醪液中的混合物首先进行烘烤使温度逐渐升高。在加热阶段，麦芽中的酶消化淀粉产生用于酵母菌发酵的糖。蛋白质、氨基酸以及酵母生长所必需的其他营养成分也释放到液体中。

烘干之后，抽提的水分称作麦芽汁（wort），通过滤器将它从外壳和其他谷物残留物中分离出来的。啤酒花（hop）是从雌性啤酒花植物中分离出来的，在此阶段加入到麦芽汁中。啤酒花是一种调味添加剂，具有抗微生物特性，可防止麦芽汁在后续发酵中被污染。接着在铜质容器中将麦芽汁煮沸几个小时（图 30.19a，b），在这一过程中，所需的成分从啤酒花中抽提出来，麦芽汁中不利于啤酒保鲜的蛋白质凝结，被去除，同时麦芽汁灭菌。然后再次过滤麦芽汁，冷却，转移进发酵罐中。

酿造：发酵过程

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）菌株主要有两种类型：上层发酵（top fermenting）和下层发酵（bottom fermenting）。这两种类型的主要区别是：上层发酵酵母（top-fermenting yeast）均匀分散在麦芽汁中，由发酵过程中产生的 CO_2 带到上层；而下层发酵酵母（bottom-fermenting yeast）始终在发酵液底部。上层酵母用于酿造浓啤酒，而下层酵母可酿造储存啤酒（lager beer）。下层酵母为卡尔酵母（*Saccharomyces carlsbergensis*），而上层酵母称为酿酒酵母。上层酵母发酵通常是高温短期发酵：14～23℃，5～7 天，而下层酵母是低温长期发酵：6～12℃，8～14 天。

下层酵母发酵的储存啤酒完成后，需再泵入到一个大罐中，在低温（约－1℃）下储存数周（图 30.19c）。储存过程完成后，啤酒经过滤，再装在储罐中，用于分装（图 30.19d）。上层发酵酿造的浓啤酒只在较高温度下（4～8℃）储存短暂时间，有助于提高浓啤酒的味道。有关酿造过程详见知识窗的“家庭酿造”。

蒸馏酒精饮料

蒸馏酒精饮料（distilled alcoholic beverage）是将发酵后的酒经高温加热，使其中大多数酒精挥发出来制成的。酒精浓缩，收集，此过程称为蒸馏（distilling），此过程可得到比直接发酵更高酒精浓度的产物，实际上，任何酒均可蒸馏得到一种独特的蒸馏酒。蒸馏麦芽酿造产品可得威士忌（whiskey），蒸馏葡萄酒可得白兰地（brandy），蒸馏糖蜜发酵的产品可得朗姆酒（rum），蒸馏谷物或土豆粉发酵的产物可得伏特加（vodka），蒸馏谷物和桧柏浆果发酵产品可得杜松子酒（gin）（图 30.20）。

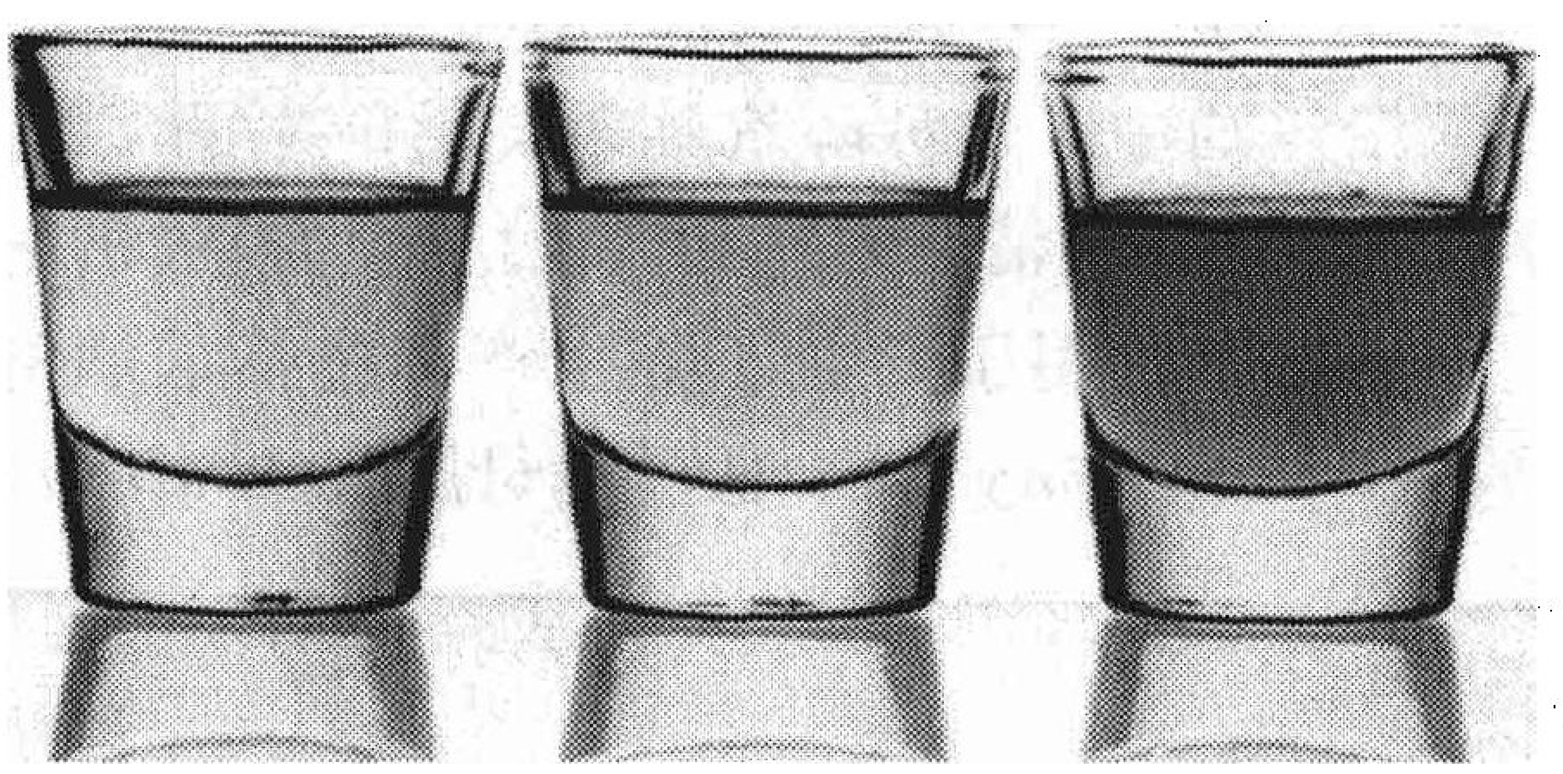


图 30.20　蒸馏酒的颜色。杜松子酒或伏特加（没显示）是无色的，而在木桶中陈酿数年后，某些蒸馏酒具有明显的琥珀色或黄色。从左向右是朗姆酒、白兰地、威士忌。

蒸馏酒不仅含有酒精，还有从酵母发酵产物或自身发酵物中挥发出来的物质，这些

副产物中有的是必需的调味剂，而有的则是不需要的成分。为了去除后者，蒸馏产品通常在木桶中陈放数年，在陈酿过程中，不需要的成分被去除，并形成了新的香味成分。新鲜蒸馏酒通常是无色的，而陈酿产物常是褐色或黄色的（图 30.20）。最终产品的特点部分是由陈酿的方式和时间长短决定的（陈酿 10 年或更长时间对于蒸馏酒是不常见的），生产蒸馏酒的全过程十分复杂，从一定程度上讲，传统工艺酿造的酒比现代方法酿造的酒更具特色。

商业乙醇

乙醇作为一种商用化学试剂，其生产是一个重要的生物催化过程，目前，每年世界上通过各种原料发酵生产乙醇的产量已超过 3000 万升。在美国，大多数乙醇是由谷物淀粉经酵母菌发酵获得，淀粉用酶（见 30.9 节）处理产生用于发酵的底物葡萄糖，发酵液经蒸馏后获得乙醇（图 30.21）。在其他一些国家如巴西，主要的乙醇生产者使用谷物或各种其他可发酵物，包括甘蔗、乳清、甜菜，甚至木屑和废纸。木材中的纤维素处理后形成葡萄糖，然后发酵产生乙醇。

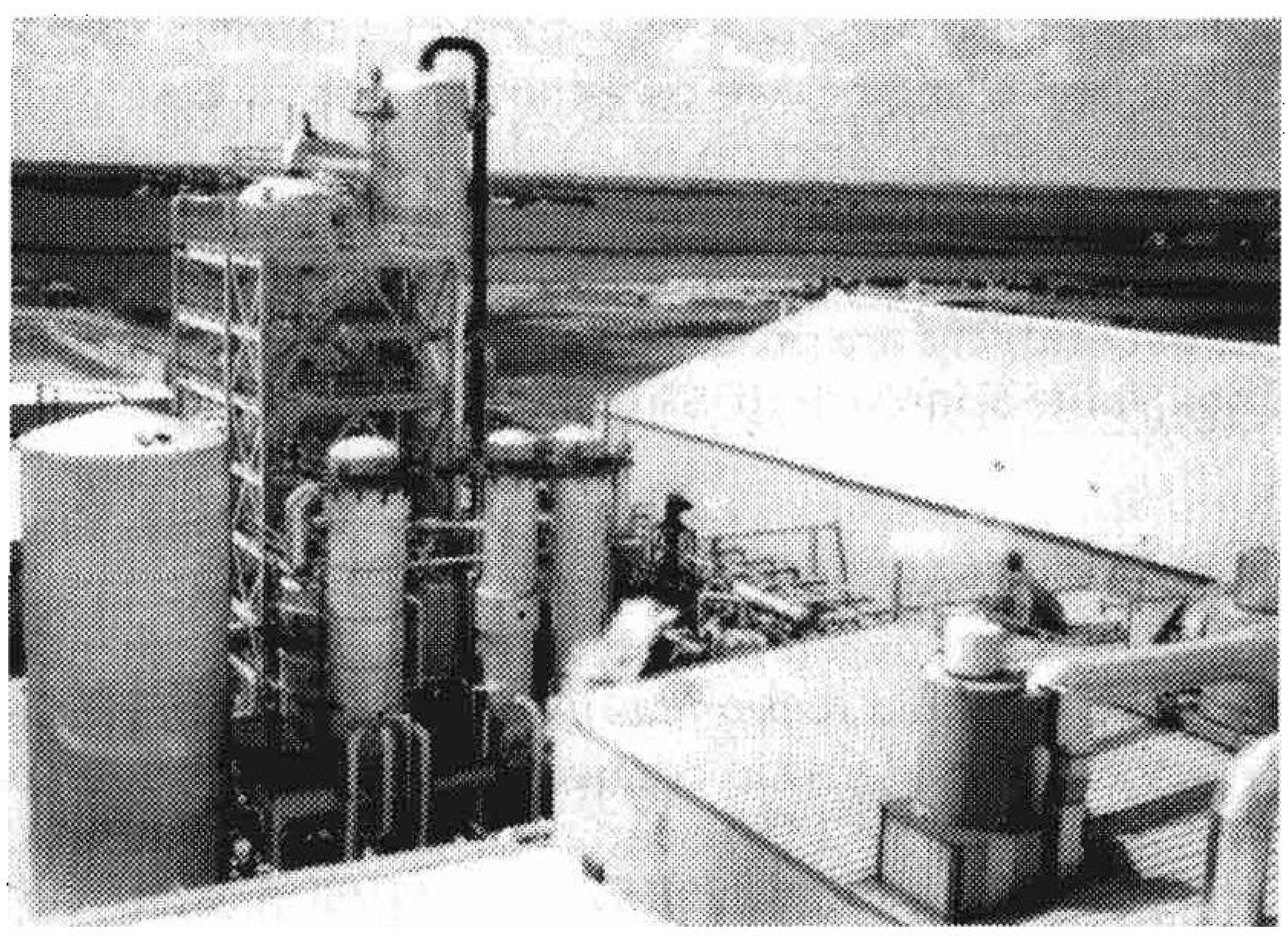


图 30.21 乙醇生产厂，美国的 Nebraska。这里从谷物中获得的葡萄糖通过酿酒酵母发酵产生乙醇和 CO_2。图中左边前面中的大罐是乙醇储藏罐，后面的罐和管道用于蒸馏发酵液形成乙醇。

乙醇可用作工业溶剂，同时也可用于汽油代用品的生产。在美国，乙醇汽油的生产是添加 10%的乙醇到无铅汽油中。这种醇汽油燃烧后产生的 CO 和氮的氧化物要比一般汽油少，因此乙醇汽油作为一种清洁燃料和汽油衍生物投放市场，在汽车污染严重的大城市被鼓励使用。各种酵母可用于商业乙醇生产，包括酿酒酵母属（*Saccharomyces*）、克鲁维酵母菌属（*Kluyveromyces*）、假丝酵母属（*Candida*），但在美国多采用酿酒酵母属来生产乙醇。

概念检查

酒精饮料是由酵母菌将糖发酵形成酒精和 CO_2，葡萄酒由葡萄汁酿造，啤酒由麦芽汁酿造，蒸馏酒由发酵产物蒸馏而成，商业乙醇可用于汽油添加剂和工业溶剂。

◆ 葡萄酒和啤酒含有的酒精量有何不同？

◆ 啤酒和浓啤酒主要不同点是什么？

知识窗：家庭酿造[a]

业余的啤酒酿造者可以制出各种啤酒，从英国的苦啤酒和印度的浓啤酒，到德国的浓味啤酒和俄国的皇家烈性黑啤酒。生产啤酒的必要设备和原料可以从当地的啤酒商店里购买，家庭葡萄酒和啤酒商业联合会，P. O. Box 1373，Valrico。FL 33595（http：//www. hwbta. org）能够提供附近商店的地址。

酿造过程可以分为三个基本阶段：①麦芽汁的生产；②发酵；③装瓶及陈酿。酿造产品的特性取决于很多因素：麦芽、糖、啤酒花和谷物的比例；酵母的种类；发酵时的温度和时间；陈酿的过程。发酵罐本身由一个20L的玻璃罐，或配上严格密封装置的大玻璃瓶构成。为了得到高质量的啤酒，与麦芽汁接触的每一个器皿必须灭菌消毒，包括发酵罐、管道、搅勺、瓶子。配制消毒剂最简单的方法是：在20L水中加入50～60ml漂白液，将上述容器浸泡约15min，然后用热水稍加清洗或空气吹干。

1. **制作麦芽汁**（图1）。在大规模的工业酿造中，麦芽汁是从麦芽中抽提出的糖和酵母营养物、糖、啤酒花制成。这一过程很复杂，很难得到满意的效果。许多家庭酿造者自己由麦芽制备麦芽汁，但直接购买已制好的啤酒花——麦芽抽提物可制得满意的啤酒。不同的麦芽可产生不同的味道和颜色，啤酒的类型取决于所选用的麦芽抽提物。制作麦芽汁的一个简单的配方是5～6lb（2.25～2.75kg）啤酒花-麦芽抽提物，加20L水，具体方法是麦芽抽提物加5～6L水，在搪瓷或不锈钢容器中加热煮沸15min（一定禁止用铝罐，因为从铝容器中浸出的金属有抑制作用）（图1），将热麦芽汁倒入已装入14～15L洁净冷水的发酵罐中，当温度降至30℃以下时，加入酵母菌，开始发酵。

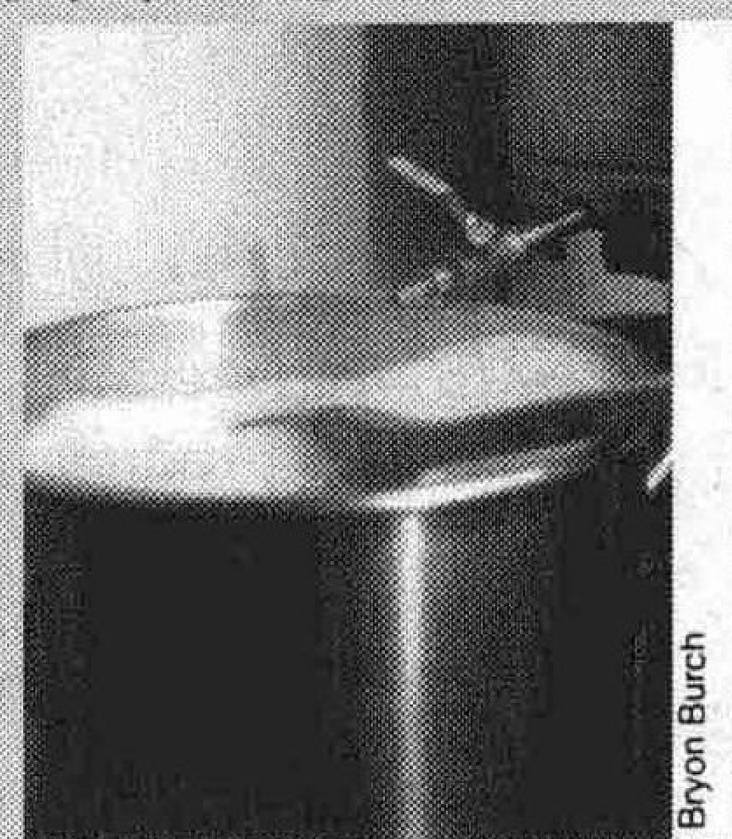


图1

2. **进行发酵（图2）**。在冷麦芽汁中加入两包新鲜啤酒酵母，然后盖好发酵罐，在发酵罐盖上有一个带橡皮阀门的塑料管，管子直插入一个装水的大桶中，在发酵最初的2～3天，大量CO_2气体从管子排出。防水阀可阻止空气中的野生型酵母菌或细菌回压到发酵罐中。3天后，可利用的糖耗尽，活性消失，这时，橡皮阀门和管子由一个很便宜的发酵锁代替，发酵锁可在家庭酿造商店购买。当生产过程中有少量气体排出时，发酵锁可防止污染。在10～15℃或更高温度下发酵7～10天。



图2

3. **装瓶和陈酿（图3）**。尽管旺盛的发酵过程停止，但发酵应持续满7～10天，这时，大多数菌体已沉到发酵罐底部，小心吸出啤酒，避免菌体层一起吸出，并将啤酒而不是沉淀物装入已灭菌的玻璃啤

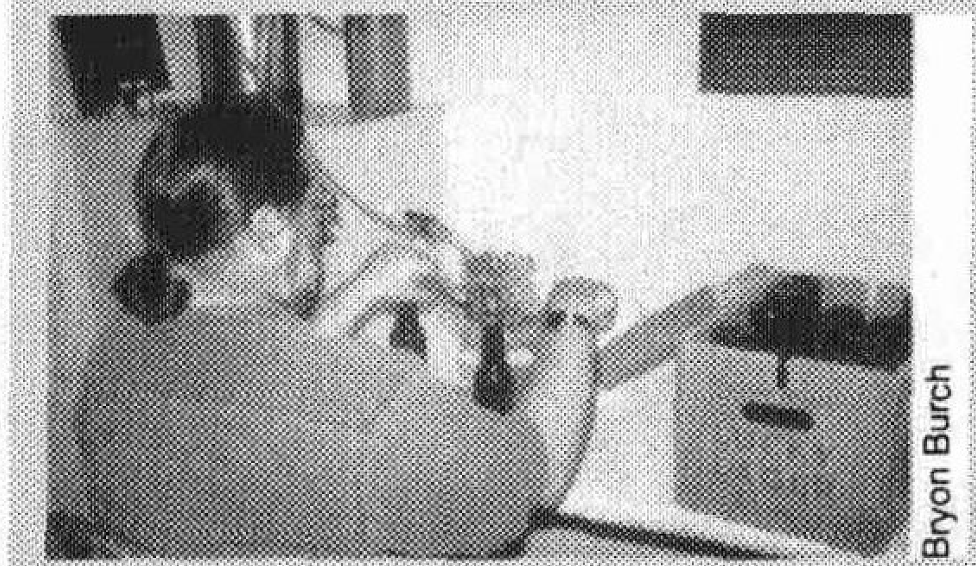


图 3

酒瓶中。所用的瓶子必须能盖上标准顶盖，且盖子必须是新的、干净的，在封盖前，每瓶加入 3/4（不要多）茶勺的谷物糖浆到每个 12～16 盎司（350～465ml）的瓶子中。瓶口一旦封好，立刻将瓶上下颠倒使糖浆摇匀，然后，使瓶正放，在室温下存放至少 7～10 天。陈酿一段时间后，啤酒在较低温度下保存。

如果陈酿几个星期，所有的家酿啤酒的品位都将提高，陈酿可使啤酒更爽滑并除去苦味成分。用相同的基本生产设备可酿制多种不同类型的啤酒，并且每种啤酒具有各自独特的品味和特点（参考脚注中所列的几种啤酒酿制方法）。典型的黑啤酒比轻度啤酒含有更多的酒精，生产它需要更多的麦芽，且常用多种麦芽混合法来酿造，如一些是来自各种较黑的谷物或是通过烘烤使糖分焦化，形成较黑的颜色。一种典型的美式轻度储存啤酒（图 4，左）约含有 3.5%酒精（按体积比），而另一种慕尼黑式黑啤酒（图 4，右），含 4.25%的酒精，浓味啤酒约含 5%酒精。

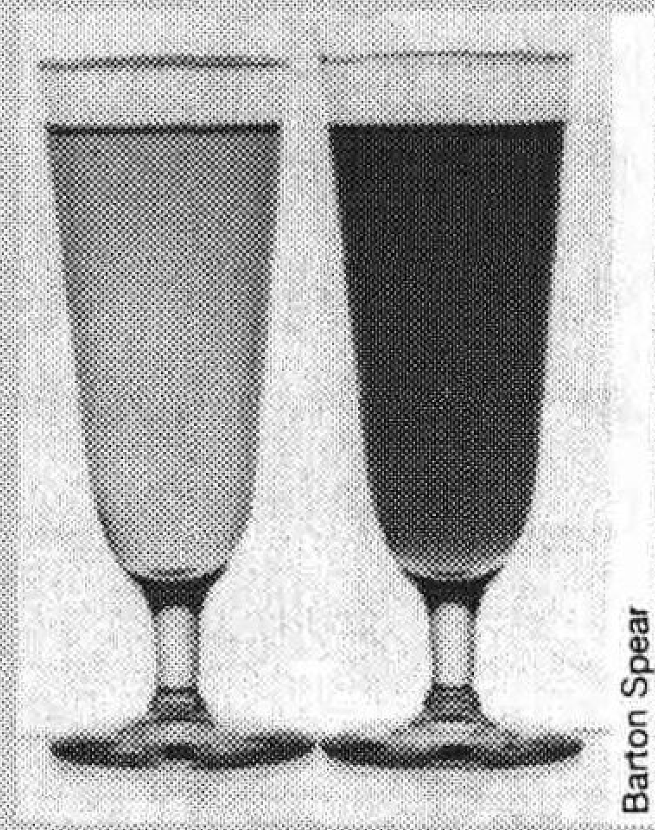


图 4

“个体酿造”啤酒的发展趋势，不仅由不断增加的家庭酿造者的数量所证明，同时也被另一个事实所证明，那就是美国大的酿造者感到越来越多的竞争，这种竞争来自于新兴的，通常是非常小的酿酒业，称之为“小型酿造厂”（microbrewery）。尽管总产量比大酿造厂少，但产品有它们独特风格和地方风味。这些区别不仅与较小规模有一定关系，而且无疑与它们的原料来源、酵母菌株、酿造时间和酿造过程的不同有关。

a 来源：Burch B. 1992. *Brewing Quality Beers-The Home Brewer's Essential Guidebook*, 2nd edition. Joby Books, Fulton, CA

30.11 醋的生产

醋是由乙酸细菌（acetic acid bacterium）将乙醇转化成主要成分为乙酸的产品。乙酸细菌重要的属包括醋杆菌属（*Acetobacter*）和葡糖杆菌属（*Gluconobacter*）。尽管一般酿醋的原料是葡萄酒、啤酒或含酒精的苹果汁，但它可以通过任何含酒精的原料制成。醋也可由纯酒精和水的混合物制得，通过此方法制得的醋称为蒸馏醋（distilled vinegar），蒸馏是指通过这种酒精制得的产物成分里不光含有醋。醋是做沙拉和其他食物时的调味佳品，又因为它的酸味，也可用于腌制。用适当的方法腌制的肉和蔬菜可在非冷冻条件下保存数年。

乙酸细菌是原核生物中一种很有趣的类群（见 12.8 节），它们是严格的需氧细菌，但不同于大多数其他的需氧菌，如葡糖杆菌属的种，因为它们不将有机电子供体完全氧

化成二氧化碳和水（图 30.22）。因此，乙醇作为电子供体时，乙酸细菌通过醌氧化乙醇为乙酸，乙酸在培养基中积累。乙酸细菌耐酸性强，不会被自身产生的酸杀死。在乙酸菌的生长过程中需要大量氧气，所以醋生产中的主要问题是保证培养基中有足够的通气量。

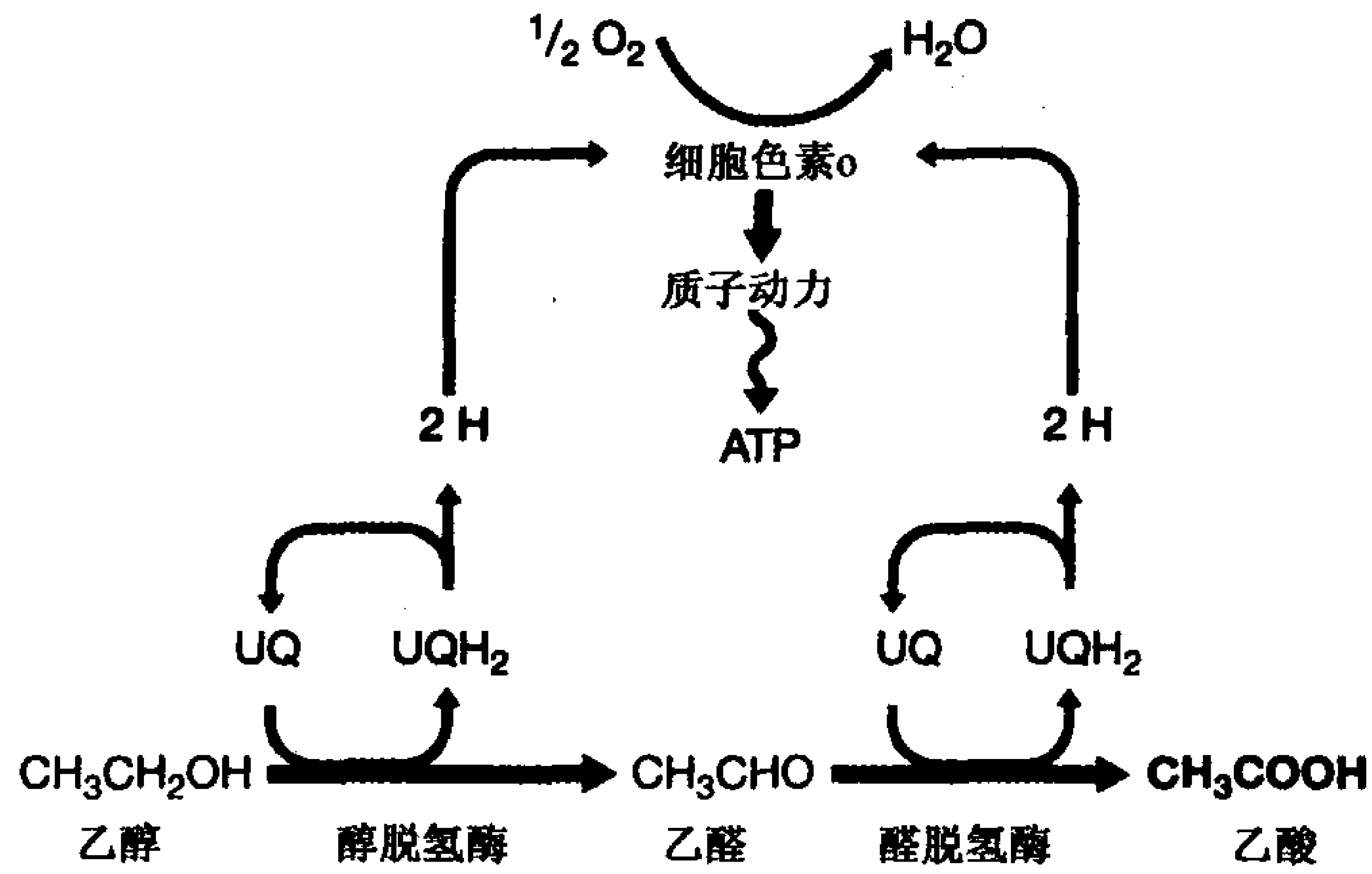


图 30.22 醋生产的化学反应。制醋中的关键步骤，乙醇氧化生成乙酸。UQ：泛醌。

醋的生产

有三种不同生产醋的方法。开桶酿造法（open-vat method，也称 Orleans 法）是较原始的方法，目前在首次开发地法国仍然使用。将酒装在很浅的桶中，这样可以充分暴露在空气中，乙酸细菌在液体表面生成一层薄膜。此过程的效率不高，因为细菌只在表层与空气和原料接触。

第二种方法是滴滤法（trickle method）（也称醋速酿法，quick vinegar），此方法中菌体和空气、原料的接触面积增大，酒精液通过装有松散捆扎的山毛榉细枝或木材刨花，同时从底部通气，乙酸细菌在刨花的表面上繁殖，可最大程度地同空气和酒精液接触，此罐称为乙酸发酵器（vinegar generator）（图 30.23），整个过程是一个连续操作的过程。乙酸发酵器中木材刨花的使用期为 5～30 年，由生产过程中所使用的酒精种类决定。

第三种起泡法（bubble method）是基本的一种深层发酵，与已经讲述的抗生素生产过程类似，适当通气，起泡法效率很高，90%～98%的酒精转化成乙酸。

尽管可以用简单的化学方法从酒精得到乙酸，但微生物方法生产出的醋别具风味，它的味道部分来自于原材料中的成分和发酵所产生的物质，由于这个原因，化学方法不能代替制醋的微生物过程，特别是使用乙酸发酵器。

概念检查

醋的有效成分是乙酸，乙酸是由乙酸细菌氧化含酒精的果汁制得的。足够的通气量是酿醋过程成功的最关键因素。

◆ 为什么酿醋过程需要 O_2？

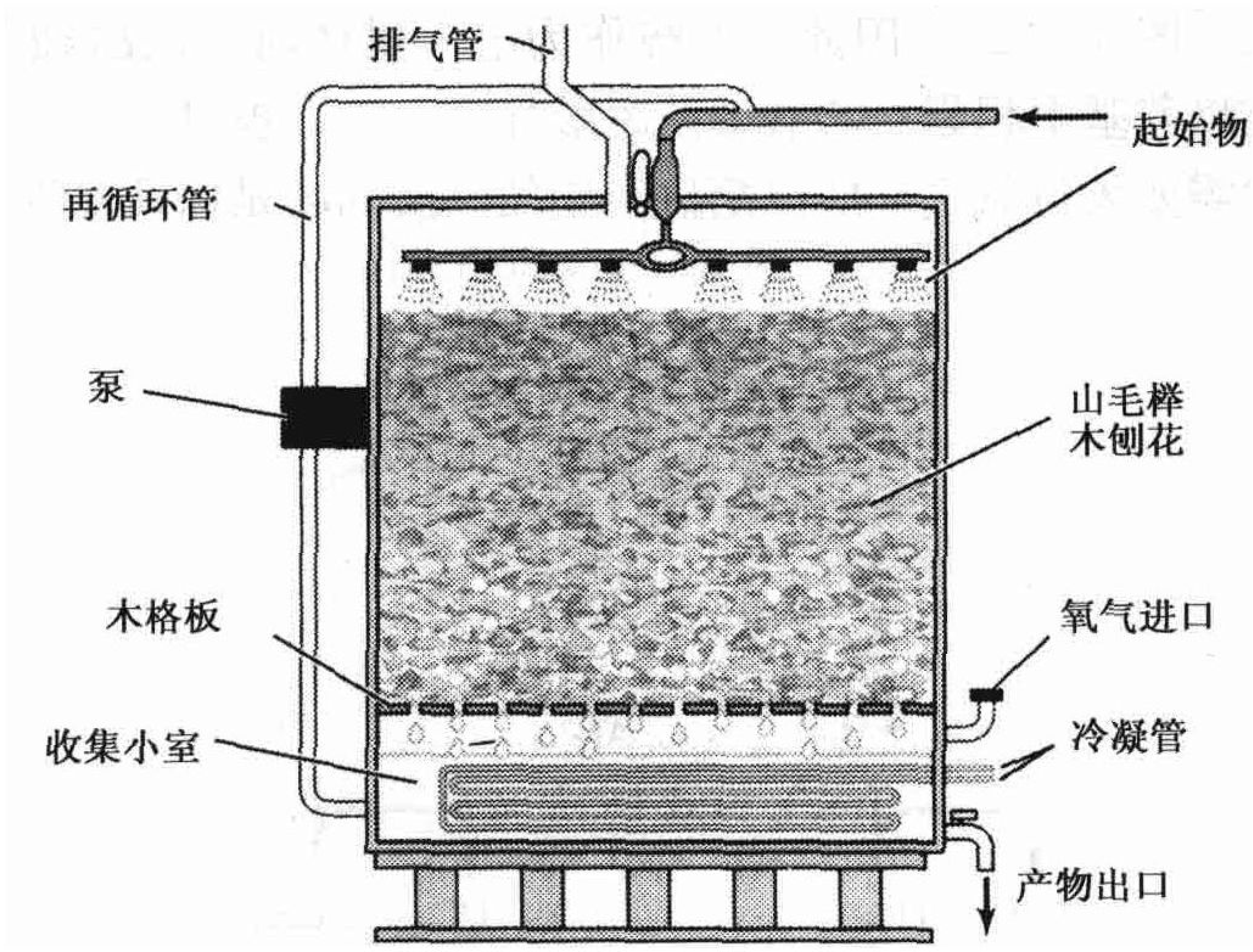


图 30.23 乙酸发酵器的示意图。酒精果汁从木材刨花上慢慢流下，同时，空气从刨花底部向上通气，乙酸细菌在刨花上生长，将乙醇转化为乙酸，乙酸液体在收集小室中积累，当乙酸浓度至少达到 4%时，通过发酵器回收乙酸，因此产品的最低浓度为 4%时，才能标明为“醋”。

◆ 为什么用滴滤法比用起泡法酿出的醋更有风味?

30.12 柠檬酸和其他有机化合物

许多有机化合物是由高产量微生物通过工业发酵产生的。例如，柠檬酸（citric acid）广泛地应用于食品工业中，作为饮料、糖果和其他食品的添加剂，用于面包发酵，也应用于工业上某些金属处理，作为去污添加剂替代磷酸盐，也应用于各种药品中。其他酸包括衣康酸（itaconic acid）用于生产丙烯酸树脂，葡糖酸（gluconic acid）用于生产葡糖酸钙盐，该盐可用于补充人体的钙不足并在工业上作为洗涤剂和软化剂。所有这些酸都是由真菌产生的。

细菌产生的重要有机化学物质包括山梨糖（sorbose），它是乙酸菌氧化山梨糖醇产生的，可用于生产抗坏血酸（ascorbic acid）（维生素 C）和乳酸（lactic acid）。乳酸在食品工业上用于酸化食品和饮料，是由各种不同种的乳酸菌产生的（见 12.19 节）。

我们这里主要讲述柠檬酸发酵。从历史角度看，柠檬酸发酵具有重要意义，因为它是第一个深层培养的好氧工业发酵。由于柠檬酸发酵非常成功，从中获得的经验应用于青霉素和其他重要抗生素的发酵中，因此，从某种程度上讲，我们应把大规模生产抗生素的成功归因于柠檬酸发酵创新工作的成功。柠檬酸生产是一个巨大的商业，世界上每年生产的柠檬酸超过了 550 000t，总价值达 10 亿美元。

柠檬酸生产：与铁的关系

柠檬酸是黑曲霉（*Aspergillus niger*）通过微生物发酵生产的。尽管通常认为柠檬酸与柠檬酸循环有关（见 5.13 节），但可通过某些生物如黑曲霉分泌大量柠檬酸而获

得。在大的发酵罐中进行好氧发酵，获得高产量柠檬酸的关键是培养基必须缺少铁，因为柠檬酸可作为螯合剂与铁络合（图 30.24a，也可见图 5.1），因此用于柠檬酸生产的培养基必须去除大部分铁离子；并且发酵罐本身应用不锈钢或玻璃制成的，以防止由于终产物柠檬酸的积累造成 pH 降低，使铁离子从发酵罐壁中渗滤出来。

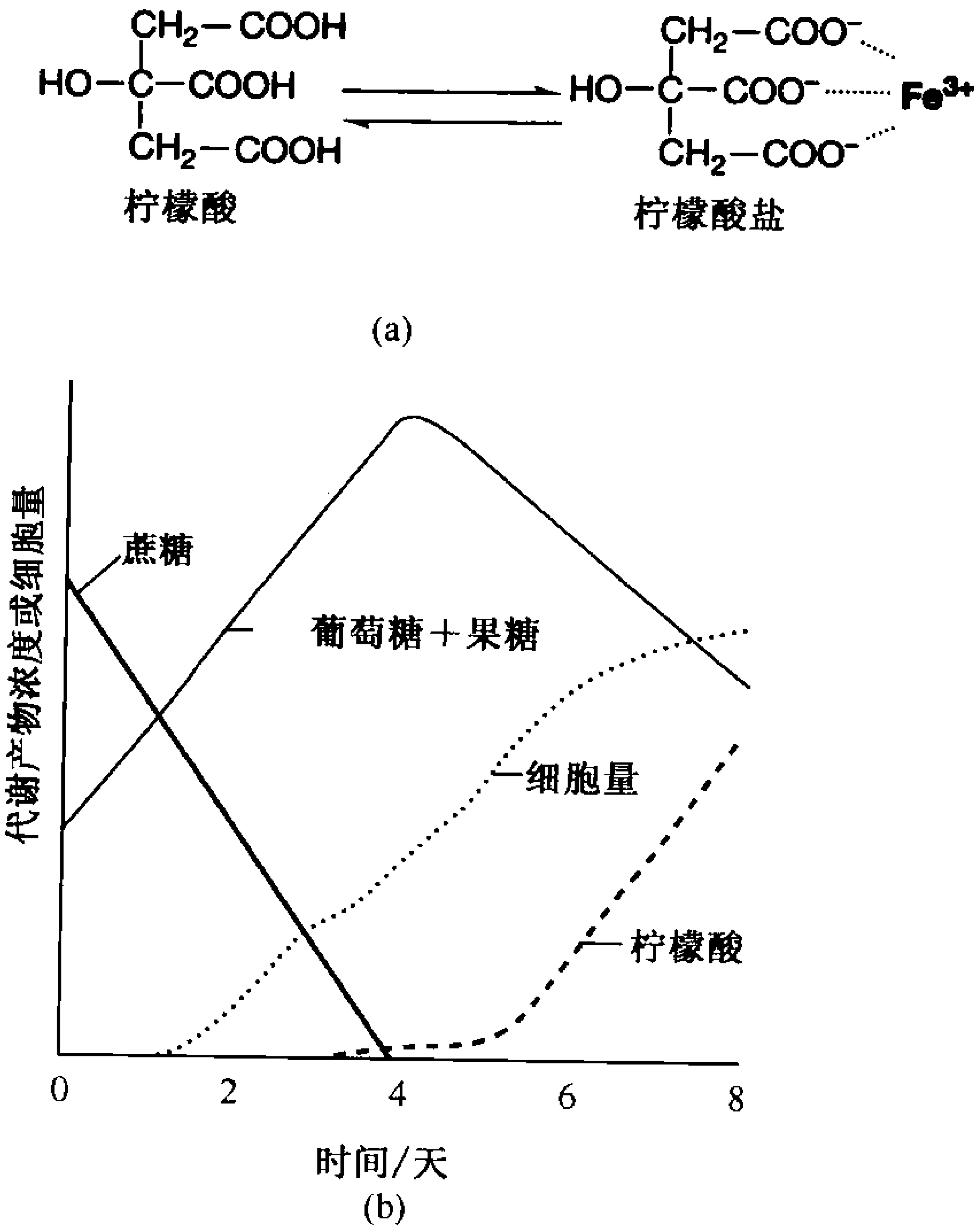


图 30.24　柠檬酸发酵。（a）柠檬酸结构。注意离子的形成，柠檬酸盐含 3 个羧基，可以络合 Fe^{3+}。（b）柠檬酸发酵的动力学，蔗糖通过蔗糖酶分解产生葡萄糖和果糖，详见正文。

柠檬酸生产：生长培养基、条件和纯化

用于柠檬酸生产的生长培养基包括各种不同的起始原料：土豆淀粉、淀粉水解产物、糖化淀粉产生的葡萄糖浆、蔗糖（图 30.24b）、甘蔗糖浆、甘蔗糖蜜和甜菜糖蜜。如果选用淀粉为原料，则真菌产生或是直接加到发酵液中的淀粉酶（表 30.4），水解淀粉为糖，糖在糖酵解途径中被分解（见 5.10 节），进入柠檬酸循环，生成柠檬酸盐。

目前，多数柠檬酸生产是在大的发酵罐中进行深层发酵。但是，因为黑曲霉是专性好氧菌，所以发酵的关键是保证整个过程有适量的氧气。此过程中产生的柠檬酸是一种典型的次生代谢物（图 30.2）。在生长期，蔗糖分解成葡萄糖和果糖，在稳定期达到最高，存在大量的这些六碳糖，被转化成柠檬酸对抗铁饥饿（图 30.24）。

柠檬酸纯化是除去真菌生物质后加入石灰（CaO），沉淀柠檬酸成柠檬酸钙，后者通过过滤浓缩，然后用硫酸处理，形成柠檬酸溶液和硫酸钙（$CaSO_4$，固体），接着第二次过滤，除去 $CaSO_4$ 晶体，最后通过蒸发形成柠檬酸晶体。

概念检查

许多有机化合物是利用微生物工业生产的，其中最重要的是在工业上利用黑曲霉生产柠檬酸。

◆ 为什么柠檬酸被认为是一种次生代谢物（图 30.2b）?

◆ 铁离子和黑曲霉产生柠檬酸之间是什么关系?

30.13 作为食品和食品添加剂的酵母

酵母菌是在工业上应用最广泛的一类微生物。酵母菌除了在烘烤面包和饮料产业的重要性外，培养酵母菌也可为了其细胞本身，或为了从细胞中抽提化合物（表 30.5）之用。与酿造和烘烤工业重要的发酵过程（知识窗：酵母发酵的产物，第 5 章）所不同的是，生产酵母细胞时为使其达到最大产量需要呼吸。作为食品和食品添加剂，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的衍生物应用非常广泛，这里我们讨论它们的大规模生产。

表 30.5 酵母的工业应用及酵母产品[a]

生产酵母细胞	用于生化研究：ATP、NAD^+、RNA
面包酵母，用于面包制作	**酵母发酵产品**
食品干酵母，用于食品添加剂	乙醇，用于工业酒精和作为汽油扩展品
饲料干酵母，同于动物饲料	甘油
酵母产物	**酒饮料**
酵母抽提物，用于微生物培养基	啤酒、葡萄酒
B 族维生素、维生素 D	**蒸馏酒**
用于食品工业的酶：转化酶（蔗糖酶）、半乳糖苷酶	威士忌、白兰地、伏特加、朗姆酒

a. 见知识窗：酵母发酵产品，第 5 章和 5.10 节、5.13 节。

酵母细胞生产

用于烤面包或营养需要的酵母菌可在大型有氧发酵罐中培养，其培养基主要原料是糖蜜。糖蜜含有大量的糖，可作为碳源和能源，糖蜜还含有矿物质、维生素、氨基酸供酵母利用。要制备酵母生长的完全培养基，需要在其中加入磷酸（作为磷源）和硫酸铵（作为硫和氮源）。

用于酵母生产的发酵罐为 40 000～200 000L，从纯原种培养开始，经过几个中间步骤将种菌的浓度扩大到足够接种的最后阶段（图 30.25a）。不能将所有糖蜜一次性装罐，因为这样会使糖过量，酵母菌将多余的糖发酵为酒精和 CO_2，而不是将其转化成菌体细胞，所以，在开始时只加少量糖蜜，随着菌体生长和糖的消耗，有控制地加入更多的糖蜜。

在生长末期，通过离心将酵母菌细胞从发酵液中分离出来，然后菌体用水洗涤，再

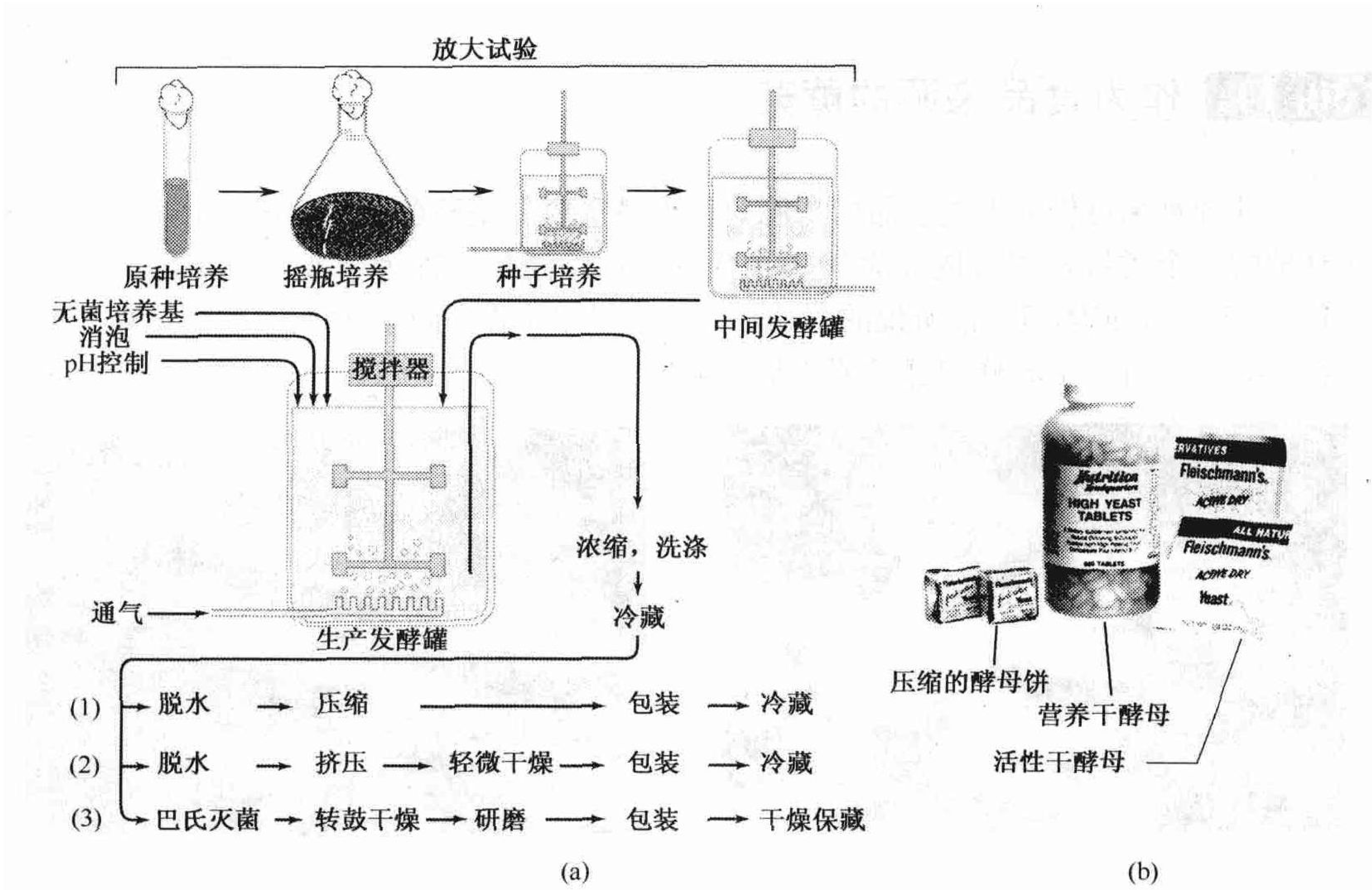


图 30.25　酵母细胞的工业生产。(a) 生产步骤。消泡剂加入到发酵罐中防止培养基表面由于通气和搅拌产生大量泡沫。(b) 消费者常见的酵母产品照片：酵母饼、袋装活性酵母、瓶装营养酵母。

离心，直至颜色澄清。市场上面包酵母有两种：压缩饼或干粉。压缩酵母饼（compressed yeast cake）（图 30.25b）是由离心出来的酵母、乳化剂、淀粉和其他添加剂混合而成的，这些添加剂使其有一合适的浓度和合理的货架寿命，然后，它被做成立方体或其他各种大小的块状，供家庭或商业使用。一块压缩酵母饼含 70%水分，因此，必须保存在冰箱中，以保持其活性。

市场上用于烤面包的干酵母，叫做活性干酵母（active dry yeast）（图 30.25b）。离心洗涤后的酵母菌与添加剂混合后，在真空下烘干直至湿度减至大约 8%，然后装到密闭的容器中，如纤维制的桶、纸板盒或多层袋子中。有时，在氮气条件下可延长保存期。活性干酵母的发酵作用没有压缩的新鲜酵母高，但具有较长的保存期。

市场上作为食品的营养酵母（nutritional yeast）（图 30.25b）已高温灭活，通常是干的酵母。酵母的细胞中，除了没有含硫氨基酸外，富含 B 族维生素和蛋白质。酵母加入到小麦粉、谷粉中提高了这些食物的营养价值，同时可加工成颗粒状作为保健食品出售（图 30.25b）。

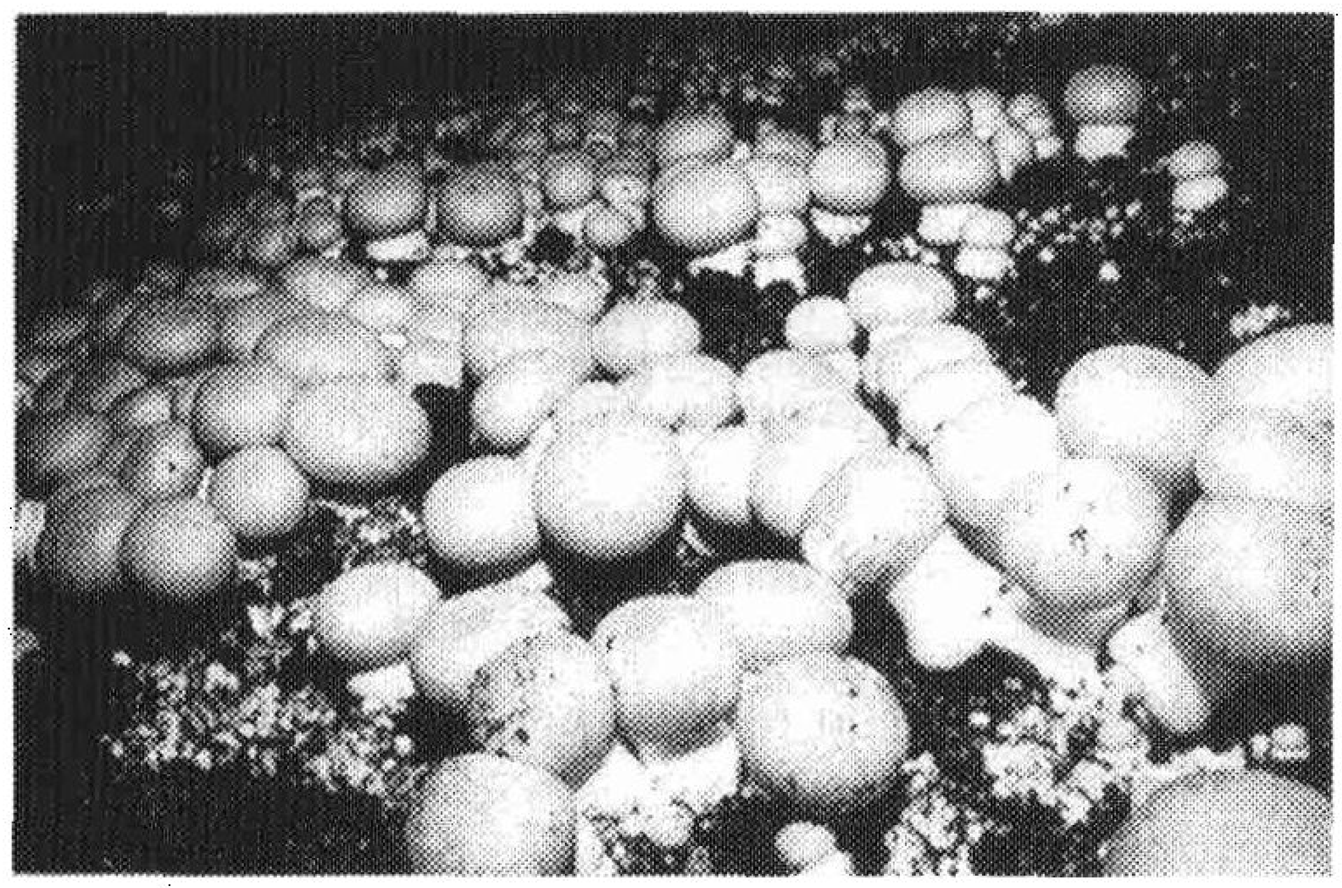
概念检查

酵母菌用于烘烤面包和食品工业，利用糖蜜作为主要的碳源和能源在大规模有氧发酵罐中生产商业酵母。

◆ 为什么在酵母生长过程中，保持发酵罐中的有氧条件是很重要的？
◆ 在商业上，可利用哪些不同形式的酵母？

30.14 作为食品来源的蘑菇

有几种真菌可作为人类食品的来源，其中最重要的是蘑菇（mushroom）。蘑菇是丝状真菌的一个类群，能形成较大的，并且可食用的结构，称为子实体（fruiting body）（图 30.26）。子实体即通常所说的蘑菇，是由大量单个菌丝联合而形成的菌丝体。我们已在 14.12 节讨论了蘑菇和酵母菌的基本生物学。



(a)



(b)

图 30.26 工业化蘑菇生产。(a) 紧密排列的双孢蘑菇（*Agaricus bisporus*）的蘑菇晕。(b) 紧密排列的香菇（*Lentinus edulus*）。

蘑菇的工业化种植

在商业上，世界上大部分地区种植的蘑菇是双孢蘑菇，通常在所谓的“蘑菇房”培养。这种生物生长在专门的蘑菇床上，温度和湿度需严格的控制（图 30.26a），蘑菇床是由土壤与富含有机质的物质混合制备的，如马粪；并且接种蘑菇菌种，它们实际上是蘑菇真菌的纯培养物，一般生长在富含有机质培养基的大瓶中。

在这个床上，菌丝体生长并穿过基质，几周之后，准备下一步，即诱发子实体形成，该步是通过在床的表面增加一层称为“覆土”（casing soil）的土壤来完成。在培养床表面长出的蘑菇称为子实体晕（flush）（图 30.26a），一旦子实体晕出现，这些蘑菇就必须立刻采集，采集之后包装和冷藏，运到市场出售。

另外一种广泛培养的蘑菇为香菇，在亚洲最广泛种植的香菇，目前在北美有了大量的需求。香菇是一种消化纤维素的真菌，在硬木上生长良好，可以在小圆木上培养（图 30.26b）。圆木先在水中浸泡吸水，然后在钻好的小洞中接入菌丝块。真菌在圆木中生长，约一年后形成子实体晕（图 30.26b），一般认为香菇比双孢蘑菇味道更鲜美，因此，具有相当可观的价格。

概念检查

微生物生产的最重要食品是蘑菇，而生产蘑菇的原因不在于它的营养价值而在于其鲜美的味道。

- 为什么蘑菇被认为是微生物？
- 什么是蘑菇晕？

复习题

1. 工业微生物与传统微生物相比，在什么方面不同？在什么方面相似？（见 30.1 节）
2. 列举三种由微生物获得的主要工业产品，并且每种举两个例子。（见 30.1 节）
3. 对比和比较初级代谢物和次生代谢物，并且每种举一个例子，至少举两种物质来解释说明为什么有些代谢产物是次生的而不是初级。（见 30.2 节）
4. 工业发酵罐与实验室培养容器有什么不同？（见 30.3 节）
5. 从通气、消毒和生产过程控制的观点来探讨放大试验的问题。为什么一个工业发酵罐的消毒比实验室发酵罐的消毒要重要得多？（见 30.4 节）
6. 列举三个在工业中很重要的抗生素的例子，对于每一种抗生素列出产生的微生物、一般的化学结构和作用方式。（见 30.5 节）
7. 对比和比较天然的、生物合成的和半合成的β-内酰胺抗生素。（见 30.6 节）
8. 在发酵培养基中添加什么金属可明显提高维生素 B_{12}的产量？（见 30.7 节）
9. 如果一种微生物过量生产并分泌一种氨基酸如谷氨酸，那么这种微生物必需具有什么特性？（见 30.7 节）
10. 微生物生物转化的定义是什么？举例说明为什么微生物生物转化中的化学反应以微生物方式完成要比以化学方式完成得更好。（见 30.8 节）
11. 列举工业上生产的三种不同种类的酶。对于每种酶，列出用于工业生产的微生物、酶活性和工业上如何应用该酶？（见 30.9 节）
12. 什么是高果糖浆？它是如何生产的？为什么用于食品工业中？（见 30.9 节）
13. 什么是极端酶？它们用于什么工业中？（见 30.9 节）
14. 啤酒的生产在什么方面与葡萄酒的生产类似？这两种生产过程在哪些方面不同？蒸馏酒的生产与啤酒和葡萄酒的生产有怎样的不同？（见 30.10 节）
15. 醋的活性成分是什么？是从什么底物生产的？为什么葡糖杆菌属适宜生产醋，而大肠杆菌不能？（提示：这里由于代谢不同）（见 30.11 节）
16. 给出两种原因说明工业生产柠檬酸为什么使用不锈钢发酵罐。（见 30.12 节）
17. 为什么酵母菌在工业上如此重要？（见 30.13 节）
18. 蘑菇的什么部分作为食物？这个结构中含有什么？（见 30.14 节和 14.12 节）

应用题

1. 作为制药公司的一名研究人员，分配给你的任务是寻找和开发一种有效对付一种新的细菌病原体的抗生素。列出一个完成该过程的计划，从一种低产新抗生素菌种的分离到获得高产的工业生产菌株。
2. 一瓶饮用过的“有机”（不含防腐剂）红葡萄酒重新盖好，存放在冰箱中 2 个月，

再品尝时，你发现有一种明显的苦味，认为这瓶葡萄酒不能饮用了。利用本章及12.8节的知识，说明（a）在葡萄酒中发生了什么微生物介导的过程；（b）这个过程可以用一种非常简单的方法来阻止。

3. 你希望生产高产量的氨基酸——苯丙氨酸用于生产增甜剂天冬苯丙二肽酯，同时你希望利用过量生产的微生物不受到苯丙氨酸的反馈抑制，而是受到过量苯丙氨酸对苯丙氨酸生物合成酶典型的阻遏。运用第8章所学的酶调节原理和第10章微生物遗传学，说明你所分离的两种类型的突变体可以克服这个问题及每种详细的遗传损害。

（李明春 译，张 峻 校）

31

基因工程和生物技术



从科学的角度考查，在试管中操纵基因，然后将人工改变后的基因转回到生物组织中并使之表达，是一项非常重要并且实用的技术。上图显示通过基因工程技术改造后，大豆获得了对草甘膦等普遍使用的除草剂的抗性。

词汇表

生物技术（biotechnology）：利用通过基因工程改造的生物体进行特定的化学过程以用于工业生产

克隆载体（cloning vector）：可重组外源 DNA 并使其得以复制的遗传单位，通常是一种质粒或一种噬菌体

DNA 指纹分析（DNA fingerprinting）：利用基因工程技术测定某组织样品中 DNA 的来源

DNA 疫苗（DNA vaccine）：利用病原体的遗传物质引起免疫应答反应

表达载体（expression vector）：携带必要的调控序列，可使克隆基因转录及翻译的载体

基因治疗（gene therapy）：导入一个正常功能基因的拷贝取代发生功能障碍的基因而达到治愈疾病的目的

遗传修饰生物（genetically modified organism，GMO）：利用基因工程改变某种生物的基因组。GM 的缩写也代表构建，如构建作物（GM crop）和构建食物（GM food）

遗传工程（genetic engineering）：在体外对 DNA 进行分离、操作、重组及表达，建立遗传修饰生物

整合型载体（integrating vector）：一种可以整合进宿主染色体的克隆载体

分子克隆（molecular cloning）：分离一段 DNA，将其插入载体，使之能够得以复制

核酸探针（nucleic acid probe）：一条可标记的核酸单链，用来与其他核酸混合物中的互补分子进行杂交

报道基因（reporter gene）：一种插入载体的基因，该基因编码的产物容易被检测到

反向翻译（reverse translation）：通过氨基酸密码表，由蛋白质氨基酸序列推导可能的 mRNA 或该基因碱基序列的过程

穿梭载体（shuttle vector）：可在两个或多个不同宿主中复制的克隆载体

T-DNA：土壤农杆菌（*Agrobacterium*）Ti 质粒上能够转入植物细胞的 DNA 片段

Ti 质粒（Ti plasmid）：是一种土壤农杆菌的质粒，它可携带基因由细菌宿主转入植物宿主

转基因生物（transgenic organism）：携带插入的克隆 DNA，并可使其稳定遗传的动物或植物

生物技术是一种利用生物体进行特定的化学过程以用于工业和商业的技术。从这个定义上看，生物技术几乎涉及所有在第 30 章或其他章节中提到的工业微生物过程。但是“生物技术”（biotechnology）这个词更意味着用于生产的生物体已经经过了体外遗传技术的修饰。

正如第 10 章中的论述，一些技术能够分离、操作 DNA 并控制其表达。在第 15 章中我们看到了这些技术如何被用于检验整个基因组。这些体外技术，特别是分子克隆技术（见 10.15 节），最终产生遗传修饰生物（genetically modified organism，GMO）。这些技术的应用被称为遗传工程（genetic engineering）。

在第 10 章和第 15 章中，我们对这些技术的介绍仅仅局限于基础研究。而基因工程有着更多的实际应用和价值。在这一章中，我们将首先看到克隆基因的范围及如何为生物技术的实际应用而高效表达。然后我们将看到基因工程微生物是如何生产有价值的产品的，这包括人类胰岛素、人类生长激素、干扰素、疫苗和工业酶等产品。

Ⅰ 基因工程技术

基本的生物技术也就是基本的现代微生物遗传技术。其中绝大多数我们已经在第7～10 章中介绍过了。而基因组学和生物信息学（见第 15 章）也在生物技术中扮演着越来越重要的角色。在这里，我们不能将它们一一回顾，而只概括其中的一些基本概念。除此之外，将对某些技术进行比较详细的介绍，因为它们正被越来越多地直接应用于生物技术中。

31.1 基因工程基本概念的回顾

大部分生物技术操作基于分子克隆（molecular cloning）技术（见 10.15 节）。在分子克隆过程中，某种来源的双链 DNA 片段与载体重组，并被导入合适的宿主中。通常使用的克隆载体（cloning vector）包括质粒和细菌噬菌体（见 10.16 节和 10.17 节）。

在很多情况下，特异的生物技术在某些方面的应用不仅仅要求鉴定并克隆一个基因，还要求对一个基因的表达进行调控，从而生产、鉴定并纯化该基因的蛋白质产物。这需要分子生物学各方面的知识，图 31.1 对这方面的一些重要概念进行了概述：

1. **DNA 化学（DNA chemistry）**：DNA 的分离、测序及合成（见 7.8 节）；
2. **DNA 酶学（DNA enzymology）**：限制性内切核酸酶、DNA 连接酶以及 DNA 聚合酶（见 7.5 和 7.7 节）；
3. **DNA 复制（DNA replication）**：DNA 复制、遗传因子、能够独立复制的 DNA 克隆载体以及聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）（见 7.4 节～7.9 节）；
4. **质粒与接合（plasmids and conjugation）**：质粒、质粒复制和接合（见 10.9 节和 10.10 节）；
5. **温和噬菌体（temperate bacteriophage）**：噬菌体复制和整合、温和噬菌体、溶原性、特异性转导噬菌体（见 9.10 节，10.8 节和 10.17 节）；
6. **转化（transformation）**：将外源 DNA 转入细胞内的方法；
7. **RNA 化学和酶学（RNA chemistry and enzymology）**：信使 RNA、RNA 聚合酶、原核生物与真核生物 mRNA 的不同、RNA 加工（见 14.7 节和 14.8 节）；
8. **反转录（reverse transcription）**：将遗传信息从 mRNA 反向转录到 DNA 上的反转录酶的活性（见 9.13 节和 16.15 节）；
9. **调控（regulation）**：转录调控、包括启动子位点和操纵子控制（见 7.10 节～7.13 节和第 8 章）；
10. **翻译（translation）**：翻译过程、mRNA 上核糖体结合位点的重要性、起始密码子的作用、正确的可读框的重要性（见 7.14 节～7.16 节）；
11. **蛋白质化学（protein chemistry）**：分离、纯化、检测和蛋白质测序；
12. **蛋白质的分泌及翻译后修饰（protein excretion and posttranslational modification）**：信号肽序列（见 7.17 节）和其他各种翻译后修饰；
13. **遗传密码（genetic code）**：几乎通用的遗传密码和编码使用上的不同（见 7.14 节）。

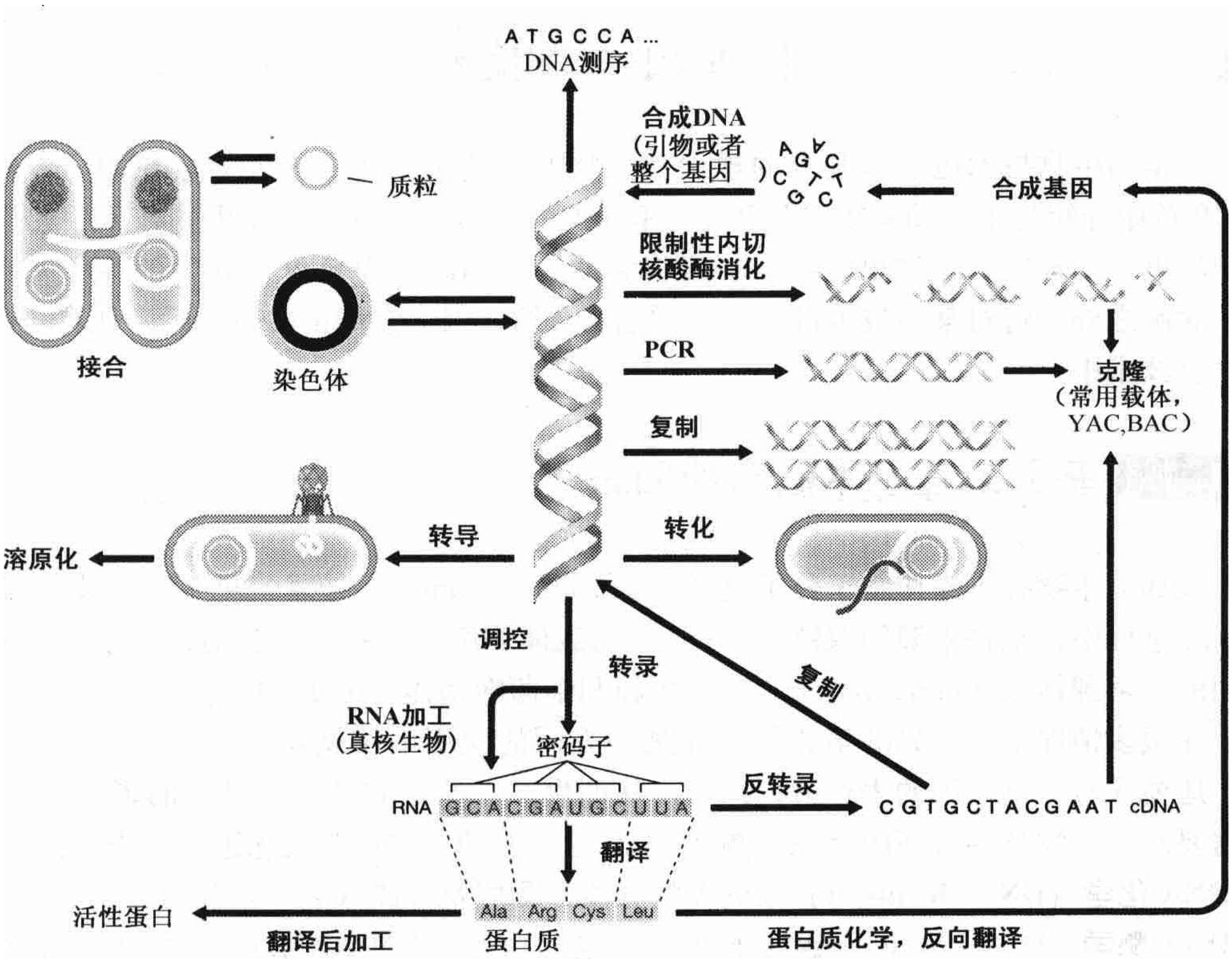


图 31.1　基因工程基本流程概述。各种技术和过程用粗体字表示。

概念检查

基因工程技术依据分子遗传学和生物化学的基本概念。成功的基因工程不仅仅基于分子克隆的实现，还需要 DNA 复制、转录、翻译的知识以及控制这些过程的调节。

- 什么是克隆载体？
- DNA 序列是如何告知我们蛋白质的结构？

31.2　克隆载体的宿主

第 10 章介绍了体外（*in vitro*）遗传技术，它是与细菌的遗传分析相联系的，其主要目的是为了研究生物体。与之相反，在生物技术之中，基因工程常用于商业目的，例如，生产大量有价值的蛋白质，生产新的疫苗或者将特殊的基因转入植物或动物体中。在这种情况下，使用什么样的宿主（host）是值得考虑的问题，这也决定了该如何选择载体。

为了得到大量的克隆 DNA，理想的宿主需要具有以下特征：①能够在廉价培养基上快速生长；②无致病性；③能够容纳外源 DNA；④具有遗传稳定性并且有适合载体复制的酶系。如果载体的遗传背景清楚且有丰富的工具能够对其进行遗传操作那就更加

理想了。克隆中最常使用的宿主是那些生长良好且研究得较透彻的模式微生物，这包括大肠杆菌（*Escherichia coli*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）及酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）(图 31.2)。这些生物体的全基因组都已完成测序（第 15 章）。

原核生物宿主

尽管绝大多数分子克隆都使用大肠杆菌，但这个宿主有一些潜在的缺点（图 31.2)。对初始的克隆工作来说，大肠杆菌是一个不错的选择，但因为这类细菌是在人类肠道中发现的，并且其野生型菌株具有潜在的致病性，所以不能用作工业生产菌株。即使是非致病的菌株，其产生的内毒素（见 4.9 节和 21.12 节）也会污染产品，特别是对药物生产来说则更加不妥；此外，大肠杆菌会在外周胞质积累胞外蛋白质从而使重组蛋白质的分离、纯化变得困难。可喜的是，经过修饰过的大肠杆菌菌株已经克服了上述大部分缺陷，并且在大肠杆菌的遗传及生化方面，我们已经积累了丰富的知识，所以目前它仍是多数克隆研究的首选宿主。

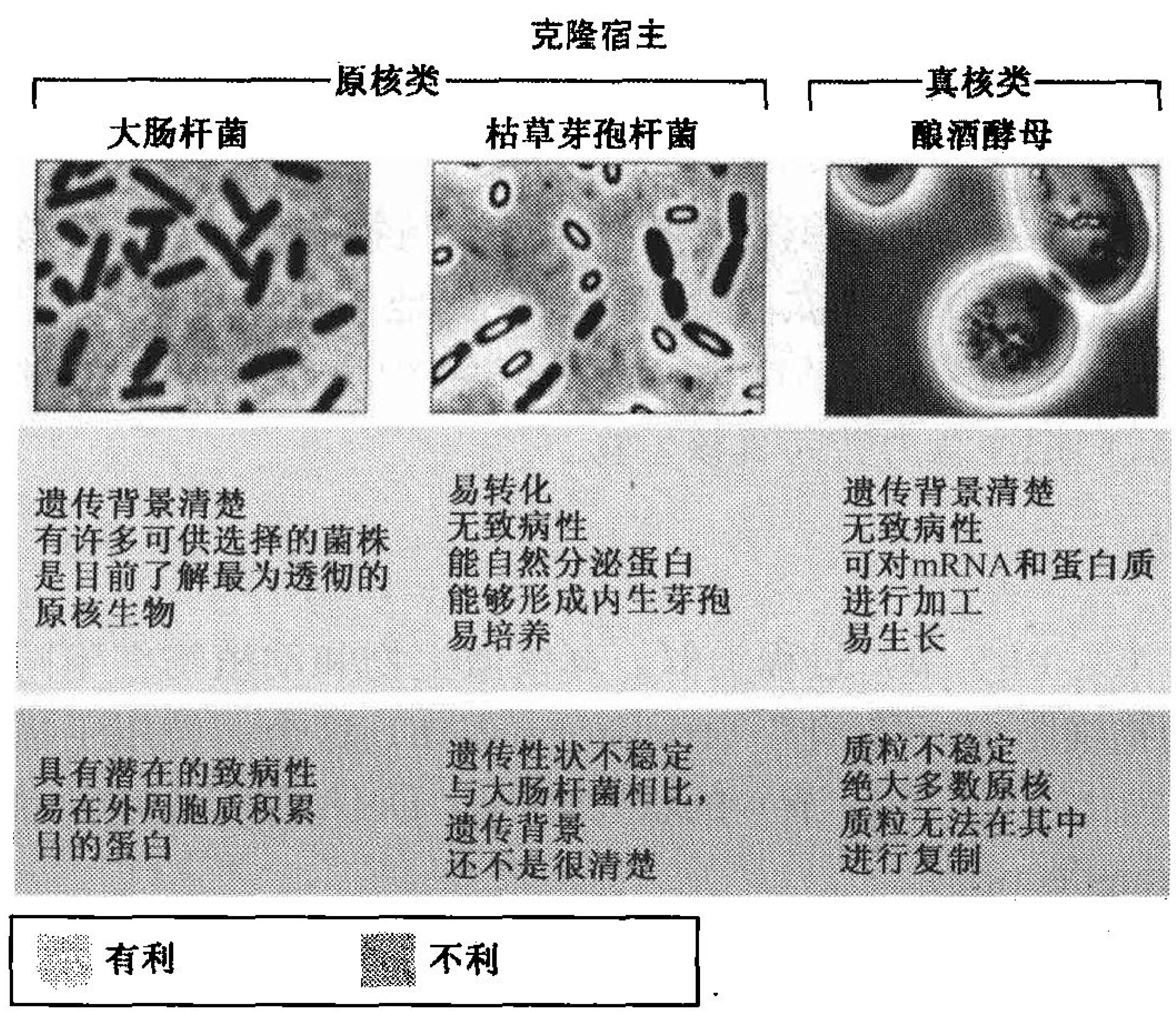


图 31.2　用于分子克隆的宿主。列出了一些常用宿主的优缺点。

枯草芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌，也常被用作克隆宿主（图 31.2)。该菌没有潜在的致病性，不产生内毒素，能形成芽孢（对某些工业过程来说，这是很有用的特性 30.1 节)，缺少外周胞质，能够将蛋白质自然分泌至培养基中。与大肠杆菌相比，尽管枯草杆菌的克隆技术还不够完善，但一些质粒和噬菌体载体已被构建出来，相应的转化技术也已比较成熟（见 10.7 节)。当然，利用枯草杆菌作为宿主也有一些不利因素。一个问题就是质粒不稳定：在多次传代后，质粒很难持续复制；此外，外源 DNA 在枯草芽孢杆菌中的复制也不稳定，造成克隆 DNA 常常意外丢失。

通常，作为克隆宿主的生物必须具备特殊的基因型已满足克隆过程中的高效选择。例如，如果载体带有 β-半乳糖苷酶基因作为选择标记（见 10.16 节和 15.1 节)，那么宿主的这一基因就必须是突变的。由于 M13 噬菌体只感染具有性菌毛（见 10.8 节和 16.3

节）的细菌，故使用 M13 衍生载体，所用的宿主就必须带有 F 质粒。因此当选择宿主时，必须考虑转化子的选择问题。

真核生物宿主

在真核微生物中克隆具有重要应用意义，特别是用于探索真核生物基因调控的细节。其中，酿酒酵母是遗传背景研究清楚、并且被广泛地作为克隆宿主（图 31.2）。质粒载体和酵母人工染色体（YAC，见 15.1 节）均适用于酵母菌宿主。

用真核生物细胞作为克隆载体的宿主具有很重要的优点，即它本身已具有高等生物合成基因产物所必需的复杂的 RNA 和翻译后加工系统。而如果真核生物 DNA 要在原核生物中克隆，载体上就必须携带有以上这些系统。特别是翻译后加工，常会导致分子克隆中出现一些问题（见 31.5 节）。

出于多种应用目的，人们需要在哺乳动物细胞中进行基因克隆。哺乳动物细胞培养系统与微生物类似，可广泛用于人类遗传学、癌症、传染病及病理学等方面的研究。但是以哺乳动物细胞作为宿主也有不利因素：价格昂贵，难以大规模生产，并且克隆基因在其中的表达量较低。昆虫细胞系易于生长，而且一种昆虫 DNA 病毒——杆状病毒（见 31.4 节）已被开发成为载体。

很多情况下，以植物细胞组织培养物甚至整个植物体作为真核生物宿主有很重要的应用价值。事实上，基因工程在农业上已经被广泛地应用（见 31.10 节）。不论是何种宿主，都必须有接纳外源 DNA 的能力。前面（见 10.6 节）已经针对原核生物讨论过这个问题，下面我们把注意力转向真核生物。

真核细胞的转染

同细菌转化（见 10.7 节）过程类似，真核微生物和动植物细胞同样能够接纳外源 DNA。在哺乳动物细胞中，“转化”（transformation）这个词被用于描述细胞发生恶性病变（肿瘤化、癌化）（见 9.12 节）的状态，因此 DNA 被导入哺乳动物细胞的过程被称为“转染”（transfection）。

对动物细胞培养物的转染最初是利用吞噬作用（见 14.10 节和 22.2 节）完成 DNA 的吸收，因为动物细胞没有细胞壁。而对于遗传工程重要的微生物——酵母，可利用多种方法实现低水平的转染。但是目前，一种被称为电穿孔（electroporation）的方法已被广泛应用于各种真核生物细胞，而不用考虑其是否具有细胞壁。电穿孔过程是将宿主细胞与克隆 DNA 的混合，暴露于电场当中，通过电刺激，在宿主细胞膜上产生小的孔洞。这些孔洞足以使克隆 DNA 通过并进入细胞内，却并不会对细胞造成致命伤害。

除了电转化之外，一种高速微粒子发射“枪”也被用于将 DNA 导入细胞。这种基因颗粒枪（particle gun）的原理与鸟枪类似，一个小的金属圆筒含有电荷动势，可向目的细胞发射包裹着核酸的微粒（图 31.3）。这些微粒在不杀死细胞的情况下穿透细胞壁和细胞膜，其包裹的核酸同时进入细胞内并和宿主 DNA 发生重组。基因枪已经成功地应用于酵母、藻类以及各种植物细胞甚至是线粒体和叶绿体的转染。此外，与电穿孔不同的是，基因枪能将 DNA 导入完整的组织（如植物种子）当中。

最后，还有一种用于动物细胞的微注射（microinjection）技术，利用微移液器将

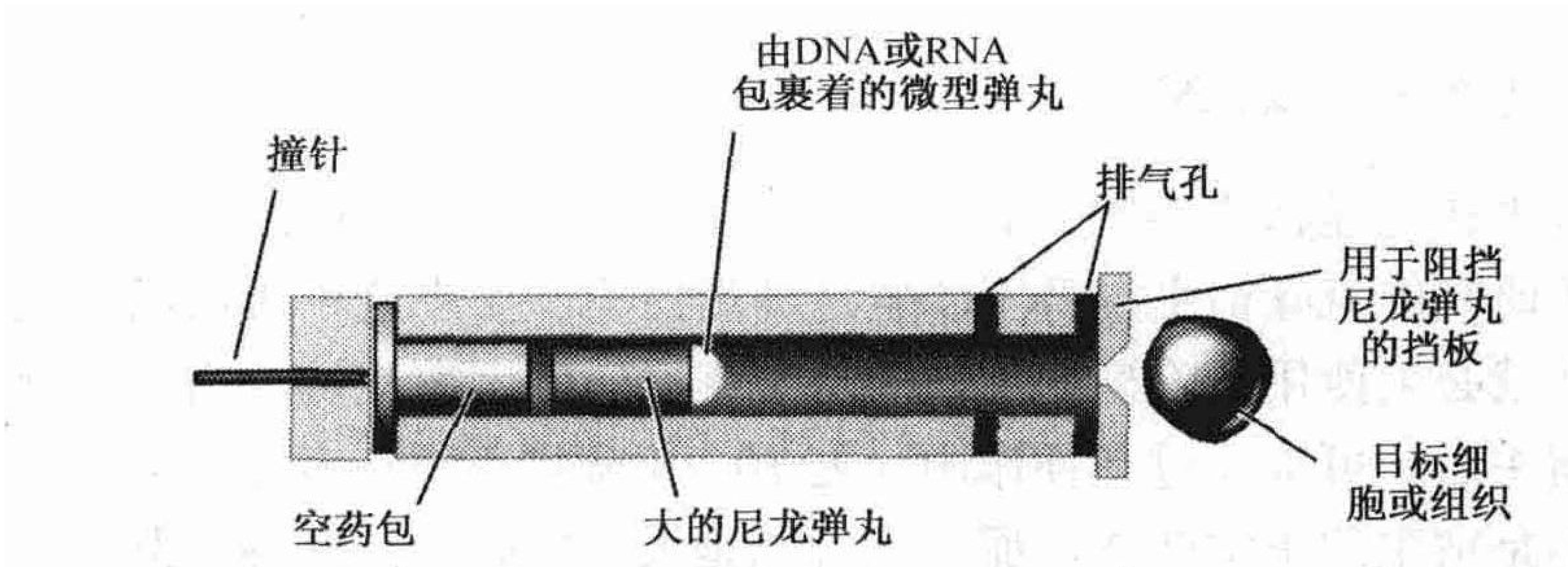


图 31.3　用于转染特定真核生物细胞的基因枪。 枪的内部结构显示了包裹了核酸的金属粒子是如何射进靶细胞的。

DNA 直接注射进细胞核。

概念检查

克隆宿主的选择决定于最终的应用目的。在很多情况下可以使用原核生物宿主，但有时使用真核生物作为宿主也是很有必要的。但不管是使用何种宿主，它都必须能够容纳外源 DNA，并且要有相应的技术手段，无论是自然的或人工的，将外源 DNA 导入到宿主之中。

◆ 为什么分子克隆需要宿主?

◆ 描述三种宿主细胞接纳外源 DNA 的机制。

31.3 寻找目的克隆

基因工程的第一步就是分离含有目的基因的克隆。之后，我们才能根据各种应用目的，对这个基因进行各种操作。但首先，我们有必要确定宿主中含有最初的克隆。

克隆 DNA 的方法包括从全部基因组 DNA（见 10.15 节）中建立基因文库（gene library），或者克隆由 PCR（见 7.9 节）产生的 DNA 片段。通常来说，当目的基因已经鉴定时，一般使用 PCR 产物进行克隆，得到目的基因的单一克隆比较容易。而在一个基因文库中有成千上万个克隆，其中只有一个或几个目的基因。

我们可以利用载体上的标记选择含有质粒载体的宿主，如抗生素抗性，只有携带质粒的宿主才能形成菌落（见 10.15）。如果载体是噬菌体，那么就可以通过噬菌斑（见 10.16 节）筛选。我们还可以利用插入失活来找出带有外源 DNA 的菌落或噬菌斑（图 10.37 和 15.1 节）。在克隆由 PCR 或其他纯化方法得到的 DNA 片段时，上述这些筛选方法已经足够了。但是，在一个基因文库中，涉及大量不同的 DNA 片段时，鉴定带有克隆 DNA 的宿主细胞则仅仅是第一步。最大的挑战是如何找到目的基因的克隆。必须检测平板上生长的大量菌落或噬菌斑才能找到其中非常少的目的克隆。有时，克隆基因会在克隆宿主中表达（即合成了相应的蛋白质），但更多时候，克隆基因是不表达的，这就需要我们去寻找基因本身。

外源基因在克隆宿主中表达

如果外源基因在克隆宿主中表达，就可以在宿主形成的菌落中检测到表达的蛋白质。这要求用于研究的克隆宿主本身不产生这种蛋白质。如果这种蛋白质是克隆宿主的正常产物，那么就必须使用缺陷型宿主，即携带有目的基因突变体的宿主，这样，当外源基因被导入宿主后，可以通过互补作用（见 10.13 节）而得到表达，从而检测到。如果这种蛋白质不是宿主的正常产物，那么就可能是天然缺陷型。这种情况下筛选含有目的基因克隆的细胞就变得相对容易。一个显著的例子就是将萤光素酶基因导入其他生物体中，则该生物能在黑暗中发出荧光（图 8.22）。

利用抗体检测蛋白质

抗体可以被用作目的蛋白质的检测。回顾第 22 章的内容可以知道，抗体是动物体产生的一种血清蛋白质，它可以高度特异性地与另一种蛋白质——抗原（见 22.4 节）相结合。在实际研究中，可以将目的基因编码产生的蛋白质作为抗原，利用它从动物体内获得特异性抗体。当目的蛋白存在于平板上的某个菌落中时，相应的抗体会特异性地与之结合。这样，通过观察结合抗体就能确定目的克隆的位置。

通常只有少量目的蛋白（抗原）存在于单菌落之中，意味着只有少量抗体能与之结合。因此，必须有高灵敏性的结合抗体的检测方法。在实际研究中，常常借助放射性同位素标记、化学发光物标记和酶标记等方法进行检测。这些方法以及其他一些高灵敏度的检测方法已经在前面的章节中介绍过了（见 24.7～24.12 节）。

这种方法是筛选（screening）而不是选择，因此必须检测成百上千个克隆。含有质粒载体的菌落及由噬菌体载体形成的噬菌斑都可以用这种方法筛选。图 31.4a 就是利用放射免疫法进行检测的过程。平板影印法（图 10.2）的过程即是将平板上的菌落影印至滤膜上，保留原平板作为主板，其余进一步的操作均在滤膜上进行。将影印的菌落裂解，使目的蛋白质（抗原）释放（如果是对噬菌斑进行筛选，可以省略此步骤，因为细菌已经被其携带的噬菌体载体裂解）。加入抗体，在抗体与抗原的结合反应发生后，冲洗掉未结合的抗体，然后加入针对该抗体的放射性试剂，用一种 X 光胶片盖住滤膜并进行曝光。如果存在带有放射性的抗体，则胶片显影后会观察到亮点（图 31.4）。该亮点的位置与主板上产生该蛋白质的单菌落位置相对应。此时便可以从主板上挑出该单菌落，进行培养。

该方法应用上的一个限制就是抗体必须是特异性的（specific）。正如第 22 章所述，抗体可以通过向动物体内注射蛋白质（抗原）获得，但所注射的蛋白质必须是经过纯化的，否则将形成多种特异性的抗体。因此，事先必须对目的蛋白质进行纯化，否则假阳性克隆将使筛选变得困难。

核酸探针：寻找基因本身

假设宿主内克隆的基因并不表达，或者缺少用于检测该基因表达产物的试剂或抗体，那么我们如何检测其在菌落中的存在呢？最常见的方法是采用核酸探针（nucleic acid probe）。核酸探针具有目的基因关键部分的核酸序列。在前面（见 7.7 节）已经介

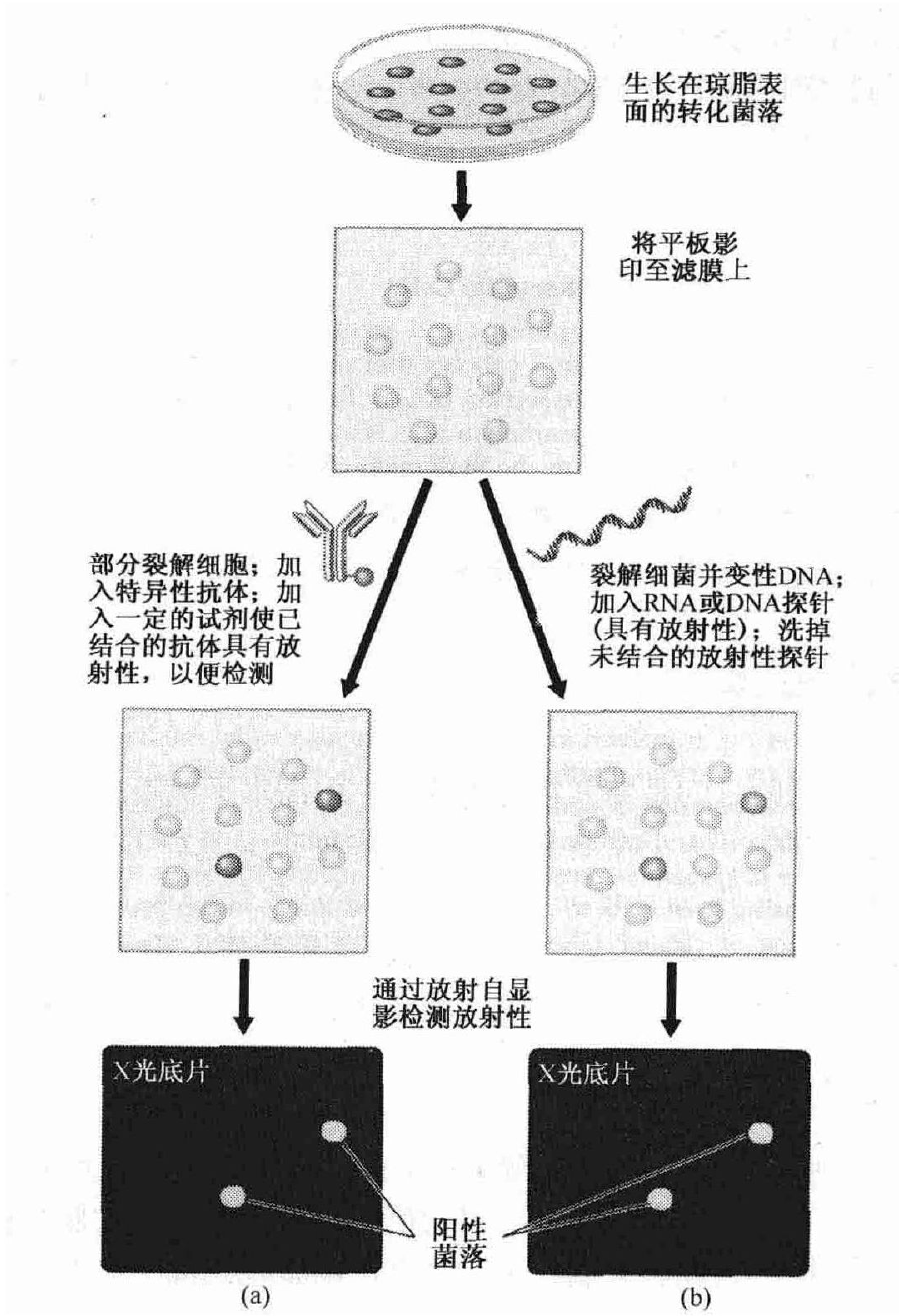


图 31.4 寻找目的克隆的技术。(a) 利用特异性抗体检测蛋白质产物。(b) 利用放射性核酸探针进行菌落杂交，检测重组克隆。DNA 与探针形成双链，吸附在膜的特定位点上。尽管图中的两种方法都使用了放射性物质，但许多非放射性的检测系统已经使用。其中包括同样利用 X 光片的化学发光物质以及能释放彩色物质的酶标物。

绍过，核酸杂交可以用于查找具有特定序列的多核苷酸。DNA 或 RNA 都可以用作探针。标记探针的一般实验步骤如下：标记常用放射性磷酸盐（$^{32}PO_4^{2-}$），但人们已越来越多地使用非同位素技术。然后用单链探针与来自克隆 DNA 的单链核苷酸杂交。由于碱基互补配对，只有当两条单链核苷酸的碱基能很好地互补时，杂交才能发生。只要控制好条件，就能控制杂交的“严谨度”，即只有在两条单链核苷酸的碱基精确互补时，杂交才能发生，这样就可以避免假阳性结果。

在菌落杂交（colony hybridization）中，核苷酸探针可以用于检测菌落中的重组 DNA，如图 31.4b 所示：将主板上的菌落影印到滤膜上（如果是以噬菌体为载体，则影印的是噬菌斑）；裂解膜上的细胞，使核酸释放；将 DNA 变性成为单链并固定于膜上；用经过放射性标记的核苷酸探针与膜上的 DNA 单链杂交；冲洗掉未结合的探针，

并将滤膜在 X 光下显影。将胶片冲洗后便可以检查上面的亮点（图 31.4b）。这些斑点表示了膜上探针与特定菌落中 DNA 杂交的位置。主板上与这些亮点位置相对应的菌落可被挑出并做进一步研究。

概念检查

检测克隆宿主中的外源 DNA 需要一些特殊的方法。如果克隆基因表达，可以直接检测外源蛋白质自身或利用其与特异性抗体的反应来证明外源 DNA 的存在。而如果克隆基因不表达，则可以利用核苷酸探针来检测基因本身。

◆ 利用核苷酸探针是否需要基因的表达？请解释原因。

◆ 要检测克隆基因的产物，为什么需要裂解带有质粒的细胞？

31.4 特殊的载体

如果克隆一个基因的目的是使其在适当的宿主中高水平地表达，那么仅仅确定克隆基因拷贝的位置是不够的。为了在染色体组研究中处理大片段 DNA，人们构建了细菌人工染色体（bacterial artificial chromosome，BAC）和酵母人工染色体（yeast artificial chromosome，YAC），（见 15.1 节）。在生物技术的研究中，人们同样构建了一些载体作为特殊的研究工具。在此介绍两种这类载体，穿梭载体和表达载体。

穿梭载体和表达载体

穿梭载体（shuttle vector）允许克隆 DNA 在无亲缘关系的生物间移动。因此，它能够在两种不同的生物体中稳定地复制。目前已经构建出能够在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌之间、大肠杆菌和酵母之间、大肠杆菌和哺乳动物细胞之间，以及许多其他成对的不同生物之间进行复制的穿梭载体。穿梭载体的一个重要特征就是，在一种生物中克隆的 DNA 在第二个不同宿主中能够稳定复制，而不需要对载体本身进行任何修饰。

某些情况下，那些能够促进克隆基因表达的载体比穿梭载体更为重要。生物体具有复杂的调控系统（第 8 章），许多克隆的基因不在外源宿主中表达。而使用表达载体（expression vector）便可以克服这一困难。表达载体不但可以克隆目的基因，还携带有必须的调控序列（regulatory sequence），可以使目的基因得到表达。

表达载体的转录调控

表达载体的关键在于其转录控制机制。要进行高水平的表达，就必须有高水平的 mRNA 产生。启动子区域就是 RNA 聚合酶最先结合的位点（7.10 节）。对细菌而言，转录起始位点上游第 10 和第 35 个核苷酸位点（称为－10 区和－35 区）在启动子中尤其重要。

克隆基因的天然启动子在新宿主中难以发挥作用。举例来说，在大肠杆菌中，真核生物及其他原核生物的启动子都难以发挥作用甚至根本没有作用。即使一些大肠杆菌自身的启动子，在大肠杆菌中也只能以低水平发生作用，因为这些启动子序列与那些“强

启动子”（见 7.10 节）序列不一致。因此表达载体所携带的启动子，在宿主中其功能有效，且位置正确，从而允许克隆基因的转录。来自大肠杆菌、被用于构建表达载体的启动子包括 *lac*（*lac* 操纵子的启动子）、*trp*（*trp* 操纵子的启动子）、*tac* 和 *trc*（合成前 2 个操纵子的杂合启动子）及 P_L（左翼 λ 启动子，见 9.11 节）。这些启动子都是强启动子，能够被特异性调控（见 8.4 节～8.9 节、9.11 节）。

能够对克隆基因的表达进行调控，在任何情况下都很重要。虽然人们希望表达载体能产生高水平的 mRNA（并使之翻译成蛋白质），但那种使克隆基因总是处于高水平转录状态的载体却不是人们想要的。事实上，一些具有商业价值的蛋白质对宿主细胞是有毒害作用的，因此在培养初期，我们并不希望这些基因被转录。理想的状况是，当培养基中的宿主细胞大量生长且每个细胞都含有许多拷贝的表达载体时，我们再通过操纵一个调控开关使这些目的基因得到表达，这样才能获得尽可能多的目的产物。

在第 8 章中我们已经讨论过基因表达调控，其中提到了“阻遏物-操纵子系统”（repressor-operator system）在基因转录调控过程中的重要作用（见 8.5 节）。一种强阻遏物可以结合在操纵子区域，进而完全阻遏相应蛋白质的合成。但是通过添加“诱导物”（inducer）可以关闭阻遏物的功能，允许操纵子控制的基因再次转录。阻遏物操纵子系统像一个开关一样控制着外源蛋白质的产生，因此在构建表达载体时，克隆基因被融合进启动子及操纵子区域之中。这样我们便能将各个遗传单元按顺序进行适当地安排：启动子-操纵子-核糖体结合位点-结构基因，这样可以保证转录和翻译有效地进行。在大多数情况下，启动子和操纵子是相对应的（如乳糖操纵子和乳糖启动子是相互配合的），但情况并不总是这样，如我们能够很容易地构建一个由 *lac* 操纵子控制的、含有 *trp* 启动子的载体。

图 31.5 显示了一个用乳糖操纵子（*lacO*）控制一个合成的、杂合 *trc* 启动子的表达载体。这个质粒还含有一个 *lacI* 基因拷贝用于编码乳糖阻遏物。这个阻遏物可以抑制由 *trc* 启动子控制的转录过程，直到诱导物的加入。乳糖或者相关的乳糖诱导物都可以启动克隆 DNA 的转录（图 31.5）。除了一个易于调控的强启动子之外，大多数表达载体还含有一个有效的转录终止子（见 7.12 节）。这个终止子可以防止整个载体的转录，从而保证载体的稳定性。图 31.5 所示的载体含有一个强终止子使得克隆基因的转录在下游终止。

使用噬菌体 T7 控制因子的载体

在某些情况下，转录控制系统可能根本就不是宿主的正常组成部分。一个明显的例子是，利用 T7 噬菌体启动子及 RNA 聚合酶作为表达载体的调控系统。当 T7 感染大肠杆菌时会编码自身的 RNA 聚合酶，这种聚合酶只识别 T7 启动子，并能有效地关闭宿主自身的转录（见 16.4 节）。因此在表达载体中可以将克隆基因的表达置于 T7 启动子的控制之下，这样只有克隆基因才能得到转录。为了实现这一目的，必须将编码 T7 RNA 聚合酶的基因也构建到载体质粒之上，并且可以将该基因置于易于控制的调控系统比如乳糖操纵子之下，这样，当乳糖诱导物存在时，T7 RNA 聚合酶的转录才会开始，随后克隆基因的表达才能发生。由于 T7 RNA 聚合酶只识别 T7 启动子，因此只有克隆基因才能得到转录，而宿主自身的其他基因将保持沉默（不转录），宿主细胞也将

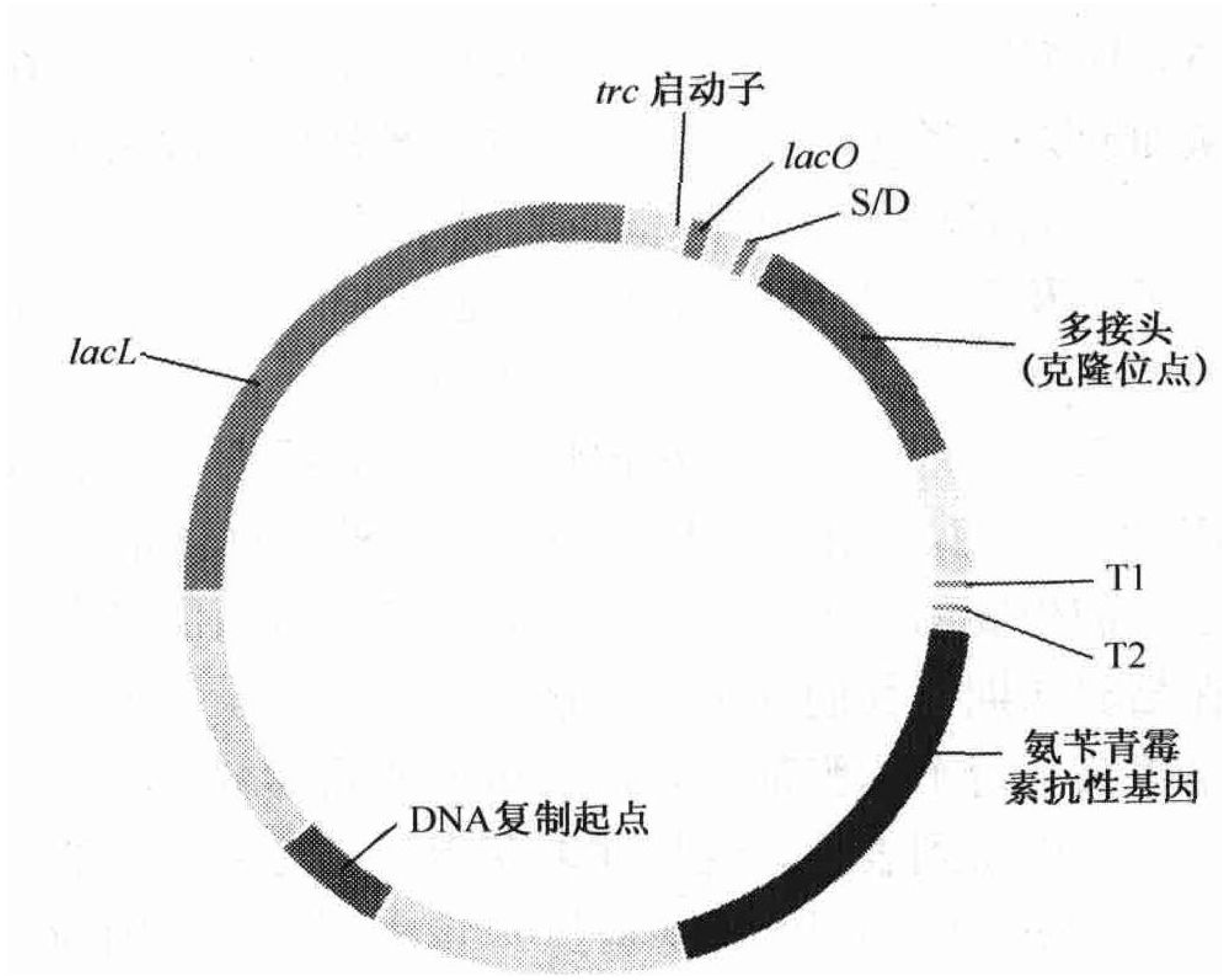


图 31.5 表达载体 pSE420 的部分基因图谱。该载体购自 Invitrogen 生物技术公司。多连接位点处含有多种不同限制性内切核酸酶的识别位点，可以方便地进行克隆操作（见 10.15 节）。该区域（包括克隆基因）的转录受到 *trc* 启动子的控制。启动子位于乳糖操纵子（*lacO*）的上游。在多连接位点的上游不远处是一段转录 mRNA 上的 SD（S/D）序列（见 7.16 节）。多连接位点的下游是两个转录终止子（T1 和 T2）。这个质粒还含有编码乳糖阻遏物的 *lacI* 基因，以及氨苄青霉素抗性基因，这两个基因由它们自身的启动子控制，没有在图中标出。

停止生长。在这些细胞中，将只有目的蛋白被合成。使用 T7 控制系统，将能够得到大量的目的蛋白。

克隆基因的翻译

除了保证克隆基因的有效转录之外，表达载体还必须能够保证转录出来的 mRNA 能够被有效地“翻译”。要使 mRNA 合成蛋白质，必须保证核糖体结合在正确的位点并从正确的可读框开始翻译。在原核生物中，只要在 mRNA 上具有核糖体结合位点（Shine-Dalgarno 序列）（见 7.16 节）以及邻近的起始密码子就可以完成翻译过程。细菌的核糖体结合位点在真核生物基因中并不存在，因此，如果要使真核生物基因得到高水平表达，必须在使用的载体中构建核糖体结合位点。图 31.5 所示载体就具有这样的位点。

为了保证基因克隆之后的高效翻译，常需要做一些调整。“密码子偏好”（codon usage）问题就是一个很好的例子。20 种氨基酸（表 7.3）中的绝大多数氨基酸都对应不止一种密码子，其中有些密码子的使用频率较高，有些较低。不同生物体对密码子的偏好也是不同的。密码子偏好现象的出现，其部分原因是由于细胞内与不同密码子对应的 tRNA 浓度不同而引起的。因此，如果一个克隆基因中包含的密码子与表达宿主的密码子偏好显著不同，那么该基因便不能在宿主中有效地翻译。要改变相应的密码子很困难，因为这将涉及整个基因上所有含有该密码子的位点。当然，如果有必要，还可以利用人工合成 DNA 或者定向突变技术（见 7.8 节和 10.18 节）改变基因中特定的密码

子，使其适应宿主的密码子偏好。

最后，如果克隆基因像真核生物基因那样含有内含子（见 14.7 节和 14.8 节），那么使用原核生物宿主无法得到正确的蛋白质产物。这一问题同样可以通过定向突变或人工合成 DNA 来解决，也有其他方法产生无内含子的基因（见 31.5 节）。

真核生物载体

以上的讨论都是关于在细菌中复制的载体。但我们经常会希望在真核生物中克隆和表达基因。这一类的载体已经被构建出来，它们的一些重要特性如图 31.6 所示。其主要特性包括：具有原核生物及真核生物复制起始位点（origin of replication）（如穿梭载体）、用于两种生物体的选择标记（selectable marker）以及多克隆位点（multiple cloning site，图 31.6）。

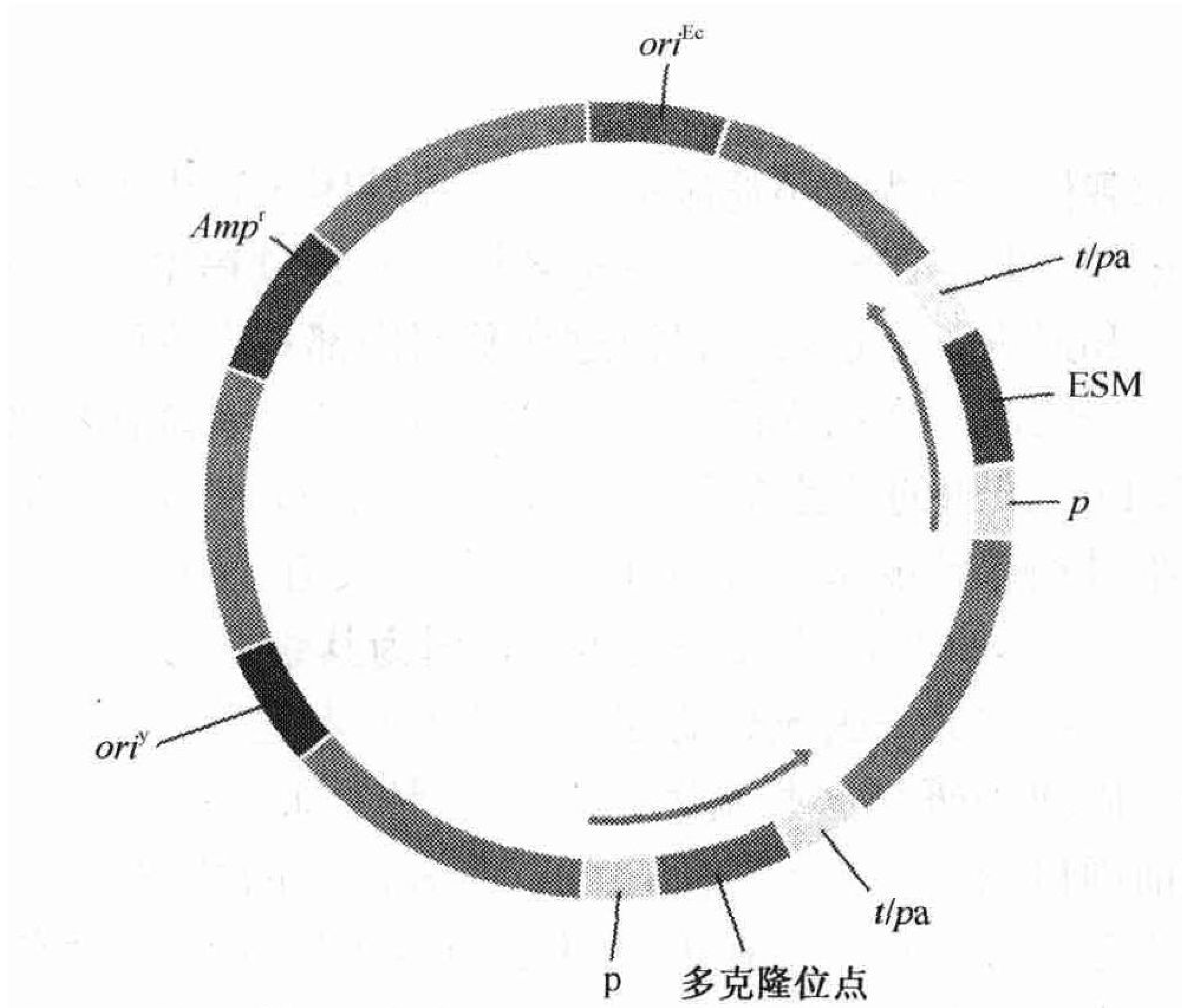


图 31.6　用于真核生物表达载体的特征。为了在大肠杆菌和酵母细胞之间进行穿梭并易于筛选。该载体带有如下一些元件：ori^{Ec}，大肠杆菌中的复制起始区；ori^y，酵母中的复制起始区；Amp^r，氨苄青霉素抗性基因；ESM，真核生物选择标记；多克隆位点。一些其他特征：*p*，启动子；*t/pa*，转录终止区/聚腺苷酸化信号（见 14.8 节）。箭头表示转录方向。

已经介绍过利用酵母人工染色体（YAC）作为载体，可在酿酒酵母中克隆大片段 DNA（见 15.1 节）。许多其他载体也可以用于酵母克隆。酵母是极少数含有质粒的真核生物之一。根据酵母质粒的大小，将其称为 2-μ 环（two-micron circle）。许多酵母载体是依据该质粒设计的。不论是遗传学研究，还是商业应用，酵母都是一种非常有价值的生物。即使如此，有时仍然需要将其他真核生物作为克隆基因的宿主。目前，已经开发出许多应用于不同真核生物（包括植物）的克隆载体（见 31.10 节）。

病毒载体（virus vector）常常被用于高等真核生物。例如，DNA 病毒 SV40（见 16.11 节）能够在灵长类动物体内引起肿瘤，该病毒目前已被构建成人类组织培养系的克隆载体，经过改造的 SV40 不会诱导肿瘤的产生，已经被用于哺乳类基因的克隆和表

达。腺病毒（adenovirus，见 16.14 节）和牛痘病毒（vaccinia virus，见 16.13 节）也作为哺乳类宿主的载体，特别是牛痘病毒，已被用于重组疫苗（见 31.8 节）的构建。杆状病毒（baculovirus）是一种能在昆虫细胞内大量复制的 DNA 病毒，由它衍生而来的载体可以用于产生大量克隆基因的产物。

另外一些特殊的表达载体被用于在生物体或组织内维持克隆基因的稳定并使之表达，这类载体称为整合载体（integrating vector），它们在生物体内的拷贝数很低（通常每个基因组只有一个拷贝）。其应用范围也很广，包括从酵母到哺乳动物细胞的真核生物及某些原核生物。整合载体在基础研究和实际应用（如基因治疗，见 31.9 节）中均有重要用途。反转录病毒（retrovirus）也可用于将基因导入哺乳类细胞，它们能够整合到宿主的染色体上，并以 DNA 的形式进行复制（见 9.13 节和 16.15 节）。

报道基因

正如许多特殊的载体能为特殊用途服务一样，在基因工程中也有许多特殊的基因或基因片段是非常有用的。我们已经看到在表达载体的构建过程中（图 31.5 和图 31.6），如何利用那些启动子和操纵子。也已经讨论过在基因内部具有克隆位点的用途，是可以利用基因的失活而易于检测。在前面的章节中已介绍，这一系统使用的是编码 β-半乳糖苷酶的基因（图 15.1）。该酶的活性在含有指示剂的平板或液体中能够很容易地被检测到，因此，编码 β-半乳糖苷酶的基因 *lacZ* 可以用作“报道基因”。

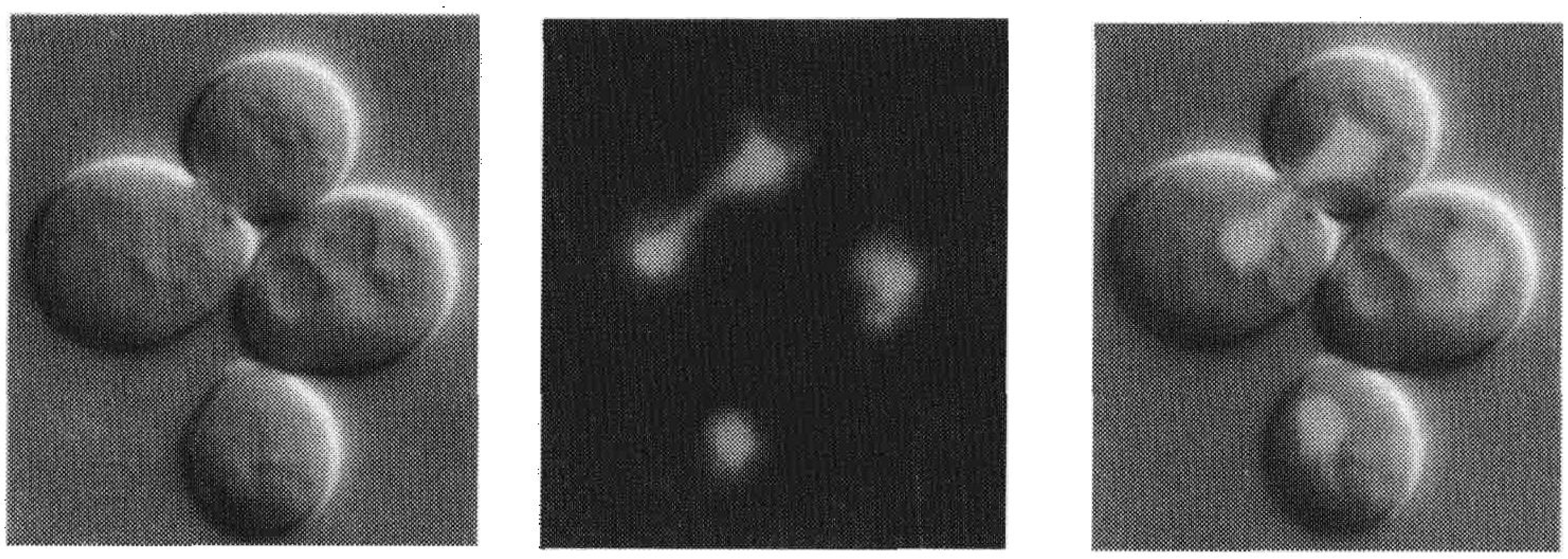
报道基因（reporter gene）被插入进载体，是因为其编码的蛋白质容易检测到。这些基因被用作指示某些特定的基因成分的存在、缺失或者位置。它们也可以被融合到某些基因或启动子中，以便于研究这些基因的表达情况。除了 *lacZ*，还有许多报道基因可供选择，如我们前面讨论过的萤光素酶，可以使表达它的细胞发出荧光（图 1.1d 和图 8.22）。通过这些荧光，我们可以在大量背景菌落中发现那些含有该报道系统的菌落。萤光素酶的产生和检测包括不止一个基因，并且还需要一些相关的因素。目前从维多利亚荧光水母（*Aequarea victoria*）克隆得到的基因，可以编码一种绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）。该蛋白质不需要相关的因素便能发光，因而被广泛用于各种生物体内作为报道基因（图 31.7）。将克隆的目的基因与 GFP 基因连接，一旦作为信号的 GFP 被表达则说明目的基因也已经表达（图 31.7）。

概念检查

许多克隆的基因无法在新宿主内有效地表达，因此人们构建出各种表达载体。这些载体携带着能够提高克隆基因转录水平并对其转录进行有目的调控的各种基因元件，并且能够对应于原核和真核两种生物的宿主。在表达载体中还存在着能提高翻译效率的信号元件。

◆ 描述一些能够提高克隆基因转录水平的表达载体元件。

◆ 克隆载体上通常含有报道基因。什么是报道基因？



(a) (b) (c)

图 31.7 绿色荧光蛋白（GFP）。 GFP 常作为蛋白质尾部用于蛋白质在体内的定位。在这一例子中，来自酿酒酵母的 *pho2* 基因（该基因编码一种 DNA 结合蛋白质）和编码 GFP 蛋白的基因被融合在一起。这个重组基因被转化正在出芽的酵母细胞，其表达出的融合荧光蛋白位于细胞核中。（a）和（b）分别是利用微分干涉相差显微镜和电子荧光显微镜（见 4.1 节和 4.2 节）观察到的正在表达 Pho2-GFP 融合蛋白的细胞。（c）将两幅图像重叠在一起。

31.5 在细菌中表达哺乳动物基因

过去，基因工程研究者们所面临的最大挑战之一是，希望克隆或表达哺乳动物的某个特异基因，且容易地找到正确的克隆。前面讨论过一些用于该目的的方法（见 31.3 节），但即便得到了一个克隆在表达载体上的哺乳动物基因，仍有一些困难需要面对，其中之一就是内含子（intron，见 14.8 节）的存在。哺乳动物编码蛋白质的基因中存在的内含子不能被原核宿主除去，由于所有的哺乳动物基因中都有内含子，若不除掉该基因在原核宿主中没有功能。在此讨论两种方法，但并不是从克隆的基因中除去内含子，而是在克隆之前去除。

利用信使 RNA（mRNA）克隆基因

一种分离有功能的真核生物基因进而克隆的方法就是利用它的成熟的 mRNA。使用该方法的主要优点就是除去了所有的内含子。分离到的 mRNA 可以用反转录的方法（见 9.13 节和 16.15 节）合成为互补的 DNA（cDNA）。通常，表达目的基因的组织中含有大量所需的 mRNA，当然也含有很多其他的 mRNA。但也有一种组织中仅含有单一 mRNA 的特殊情况，这就为克隆该基因而从组织中抽提大量 mRNA 提供了关键的第一步。

典型的哺乳动物细胞，有 80%～85%的 RNA 是核糖体 RNA，10%～15%是转运 RNA（tRNA），只有 1%～5%是信使 RNA。尽管含量较低，真核生物中的 mRNA 却比较容易鉴定，因为在 mRNA 的 3′端有一个 polyA 尾巴（见 14.8 节）。将细胞抽提物通过一根含有 polyT 片段（固定于纤维素支持物上）的色谱柱，由于 A-T 碱基的互补配对作用，可以将绝大部分 mRNA 与其他 RNA 分离开。将这些 mRNA 从色谱柱上洗脱下来便能富集大量 mRNA。

一旦分离得到 mRNA，接下来就是将其携带的遗传信息转换成 DNA 形式。这一过

程需要反转录酶（reverse transcriptase）。这种酶是反转录病毒复制（见 9.13 节和 16.15 节）必不可少的成分，它能够通过反转录过程（reverse transcription，图 31.8 和图 31.8）将遗传信息从 RNA 复制成 DNA。反转录酶需要一小段引物才能开始工作（在反转录病毒的感染过程中，引物是 tRNA）。在利用信使 RNA 进行克隆的过程中，使用 oligo-dT 引物与 mRNA 的 polyA 尾巴互补杂交，随后加入反转录酶。

如图 31.8 所示，新合成的互补 DNA（cDNA）末端有一个发夹环结构，这是因为在拷贝了 mRNA 后，反转录酶又开始了新拷贝 DNA 的合成。这一“发夹”环为继续合成 DNA 互补链提供引物。最终得到一条双链 DNA，一个“发夹”将双链连接起来。此时再用一种特异性的单链核酸酶处理，便得到所需的双链 DNA，其中的一条链是与 mRNA 互补的（图 31.8）。双链 DNA 含有所需的基因，可以插入质粒或其他载体中进行克隆。特异克隆的检测见 31.3 节。

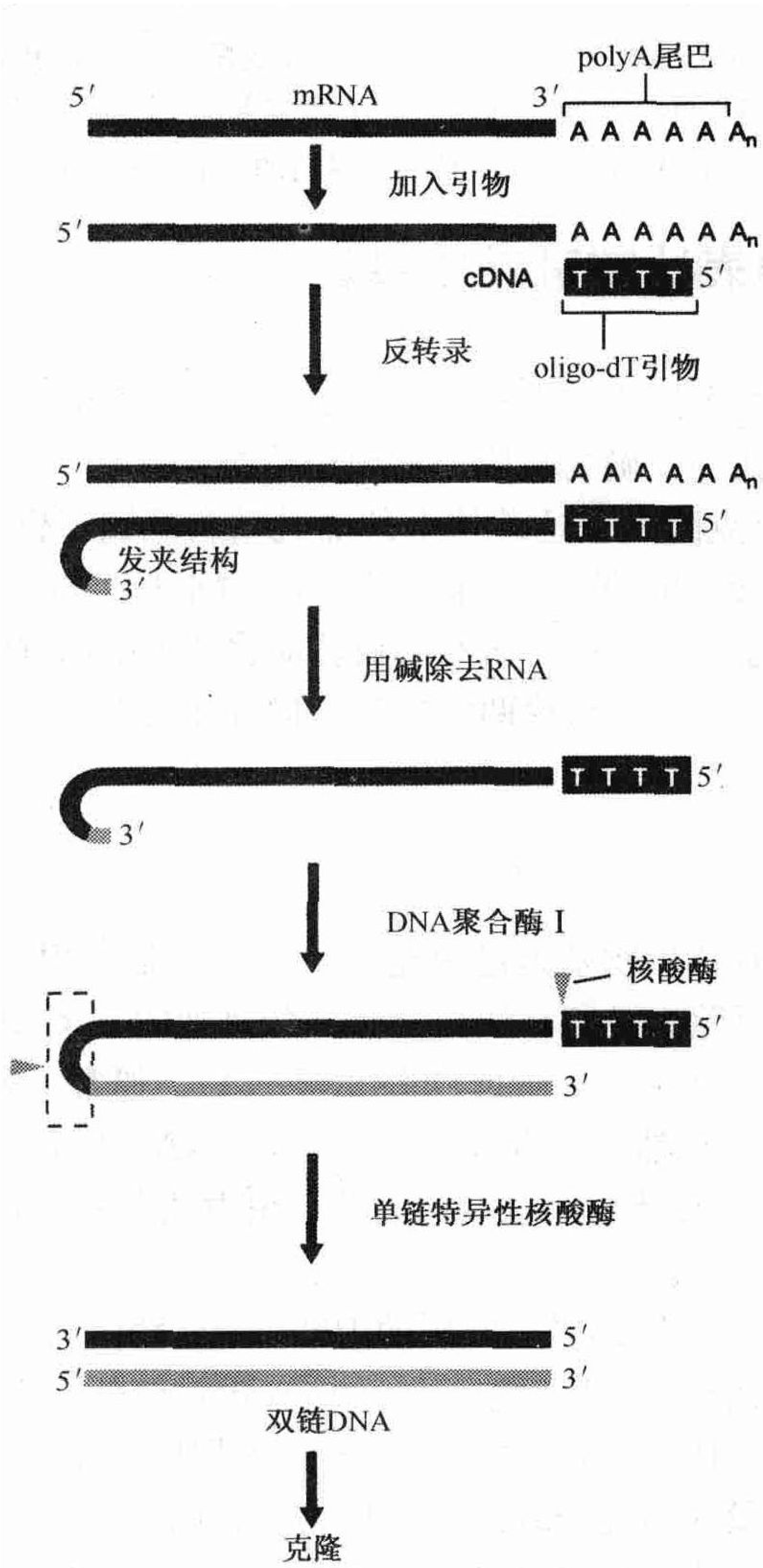


图 31.8 互补 DNA (cDNA)。图中展示了利用反转录酶，以分离的 mRNA 为模板合成 cDNA 的过程。polyA 尾巴是真核生物 mRNA 的特征（见 14.8 节）。

用这种方法得到编码目的蛋白质的 cDNA，并且没有内含子。此类 cDNA 有起始密码子，但却没有启动子故不能转录，因为启动子序列是不包含在 mRNA 中的（见 7.8 节）。如何使这样的基因高水平的表达，已在前面的章节中已经讨论过了（见 31.4 节）。

由蛋白质推导基因

了解某个基因序列，可以在基因文库中发现该基因或利用 PCR 方法克隆基因。因为可以根据已知的基因序列去设计与其互补的 DNA 分子作为“探针”（probe，见 7.8 节）。而对一种蛋白质的氨基酸序列的了解同样有用，可有助于准确地构建一个基因。

根据蛋白质的氨基酸序列设计并合成编码该蛋白质的寡核苷酸探针，是一个反向翻译（reverse translation）的过程，见图 31.9 所示。不幸的是，密码子的摆动（见 7.14 节）使这一过程变得有些复杂。绝大多数氨基酸对应不止一个密码子（表 7.5），且各种生物体中密码子的偏好也不同。因此，一个基因中最适合用作合成探针的区域是那些富含对应单一密码子（single codon）氨基酸的蛋白质编码区域（如甲硫氨酸只对应密码子 AUG；色氨酸只对应密码子 UGG）；其次是那些富含对应于两种密码子的氨基酸区域（如苯甲氨酸对应于密码子 UUU 和 UUC；酪氨酸对应于密码子 UAU 和 UAC；组氨酸对应于密码子 CAU 和 CAC）。这样的策略使得合成出来的探针能够精确（或者比较精确）地与 mRNA 或目的基因互补结合。如果不知道蛋白质的全部氨基酸序列，通常使用蛋白质的开始端作为合成探针的模板序列。

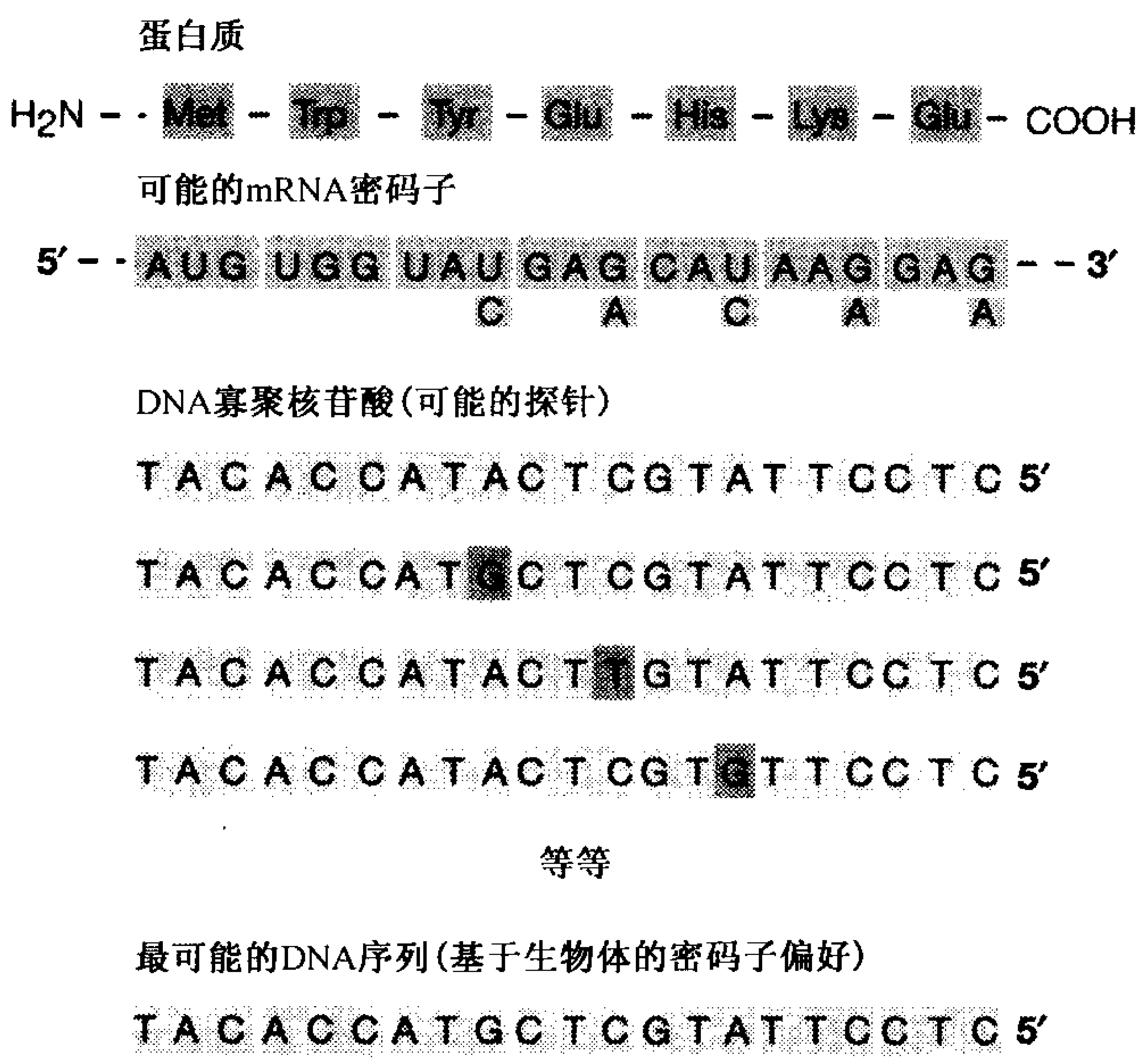


图 31.9　从蛋白质的氨基酸序列推导最佳的寡核苷酸探针序列：反向翻译。因为密码子的摆动性（见 7.14 节），可以推导出多种探针序列。如果知道生物体对密码子的偏好，则从中选择最佳的探针序列。探针序列不必要完全准确，特别是较长的探针，少量的错配是可以容忍的。

对某些小蛋白质来说，可以指导合成整个基因。很多哺乳动物蛋白质（包括很高药用价值的多肽激素）都是翻译后加工的产物（见 8.3 节），因此都很小。所以，如果要

生产多肽激素，直接构建最终激素的编码基因要比从蛋白质推导基因更有效。此外，化学合成不仅能得到那些难以获得的基因，还能合成修饰的基因（modified gene），使新蛋白质更有用。当前的DNA分子合成技术已经比较成熟，已经可以合成编码超过200个氨基酸残基（600个核苷酸）的基因。这种方法最初用于在细菌中生产人胰岛素，将在31.6节讨论。应该注意到，构建的基因不含内含子，从而省略mRNA的加工过程；并且，启动子及其他调控序列可以很容易地加入到编码基因的上游，同时也可根据宿主不同的密码子偏好（见7.14节）来设计相应的序列。

使用这些技术，我们已经利用细菌的调控系统高效表达了大量人体及病毒蛋白质，其中包括胰岛素（insulin）、病毒抗原（virus antigen）、干扰素（interferon）和生长激素抑制素（somatostatin）（见31.6节和31.7节）等。

蛋白质的折叠及稳定性

在新的宿主中合成蛋白质，还可能遇到一些我们暂时还没有讨论到的问题。例如，一些蛋白质在分离纯化之前，就已经被宿主的胞内蛋白酶降解。此外，一些真核生物的蛋白质对原核宿主细胞有毒害作用，在大量的蛋白质被合成之前宿主细胞就已经被杀死。为了避免这些问题，有必要对宿主或载体做进一步地改造。

有时，当外源蛋白质在宿主中过量表达时，会形成包含体（inclusion body）。尽管包含体有一定的大小相对容易纯化，但这种形式的蛋白质很难重新溶解。通常，包含体的形成是因为蛋白质没有正确地折叠。一种可行的解决办法就是使用能够过量表达分子伴侣的宿主，帮助这些蛋白质进行正确地折叠（见7.17节）。另一种解决蛋白质折叠的方法是利用融合蛋白（fusion protein），将目的基因编码蛋白质与载体蛋白融合。这将涉及2个融合基因的释放，接下来转录和翻译出一个、但是可以切割的蛋白质。如果融合蛋白中的另一蛋白质具有快速、廉价的纯化技术，则目的蛋白质通常很容易纯化出。

现在已经有一些特殊的“融合载体”（fusion vector）可供使用。利用特殊蛋白酶的纯化后，“克隆蛋白质”便可以从融合蛋白中释放出来。图31.10所示的就是一个融合载体同时也是表达载体。某些情况下，克隆蛋白质还可以通过特殊的化学处理从融合蛋白中取出。融合系统不但可以用来增加蛋白质的稳定性，它的另一个优点是可以将载体的一部分构建成细菌“信号肽”（signal peptide）的编码序列，表达出来的融合蛋白可以通过细胞膜转运到胞外（见7.17节）。这样细菌表达系统不但可以合成哺乳动物蛋白质，而且还能将其分泌到胞外。使用合适的宿主和载体，目的蛋白质可以超过200 000个分子/细胞，占到细胞中蛋白质分子总量的40%。

概念检查

哺乳动物基因可以在原核生物中高水平表达，但所表达的基因必须是不含内含子的。可以用两种方法获得不含内含子的真核基因：一种方法是利用反转录酶从编码蛋白质的成熟的mRNA合成cDNA；另一种方法是在目的蛋白质氨基酸序列已知的条件下直接合成其基因序列。克隆蛋白质的稳定性和可溶性问题通常利用融合蛋白来解决。

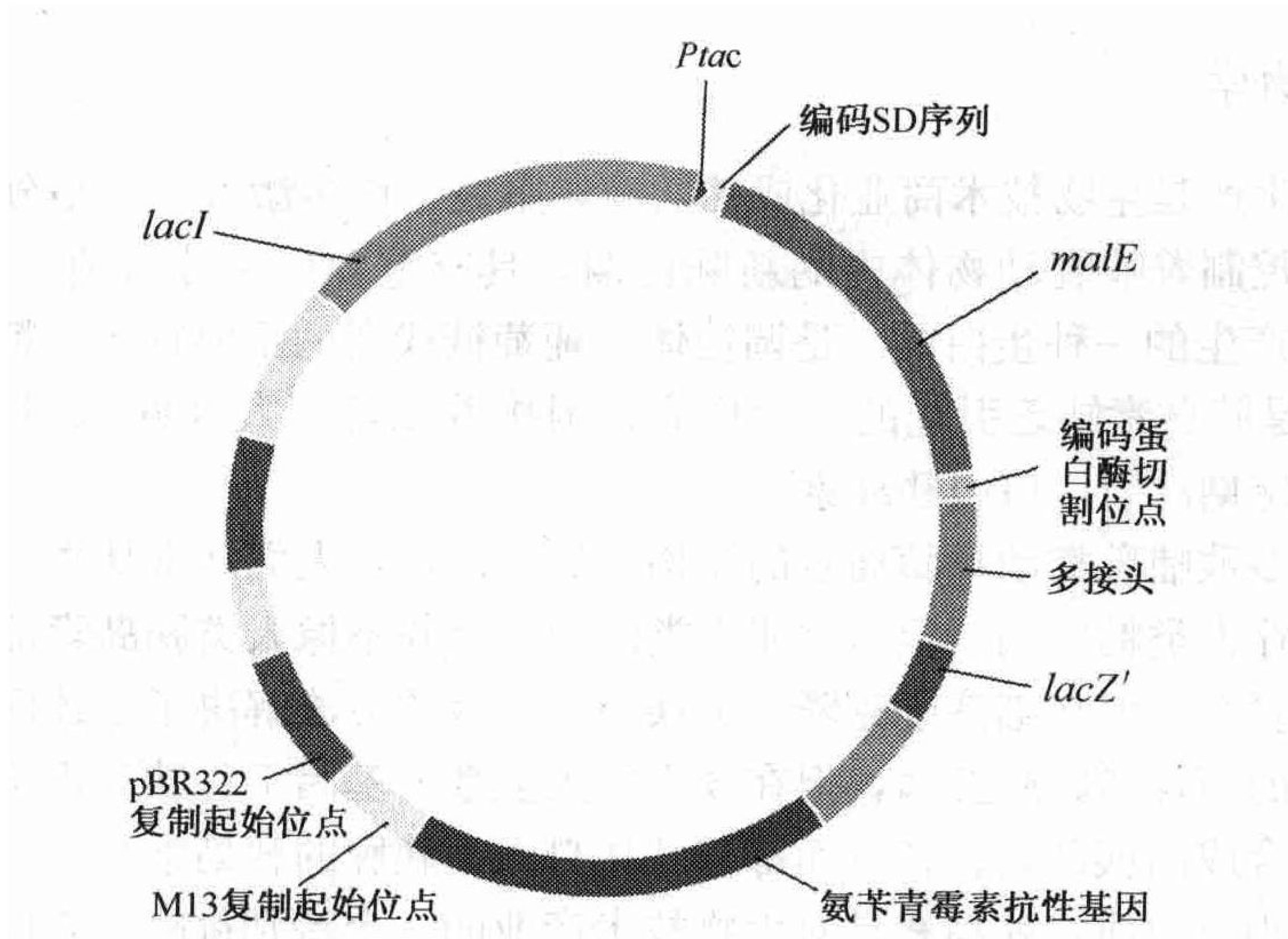


图 31.10 一个融合表达载体。这个载体是由 New England Biolabs 公司所构建。克隆基因被插入到多连接位点中（图 15.1），位于 *malE* 编码麦芽糖结合蛋白质基因下方。且克隆基因的插入会导致 *lacZ'* 基因（图 15.1）失活。融合基因处于杂合的 *tac* 启动子（*Ptac*）的控制之下。这个质粒还含有 *lacI* 基因，编码 *lac* 阻遏物。因此要启动 *tac* 启动子，必须加入诱导物。通过麦芽糖结合蛋白质可以很容易地纯化融合蛋白。之后，可以使用特异性的蛋白酶（factor Xa）将融合在一起的两个蛋白质分开。载体还含有氨苄青霉素抗性基因。此外，除了质粒本身的复制起始区之外，还有一个 M13 噬菌体的复制起始区。因此这是一个噬菌粒，既可以作为质粒复制又可以作为噬菌体复制。

◆与直接利用 PCR 扩增并克隆原始基因相比，从 mRNA 克隆或直接合成哺乳动物基因进行克隆有什么主要优点？

◆ 融合蛋白是如何产生的？

Ⅱ 基因工程的实际应用

我们在这里提到的只是基因工程在生物技术中的一小部分应用，主要集中在医学和农业方面的重要应用上。除此之外，还有许多潜在的或正在开发的应用，其中特别值得一提的是工业发酵技术的改进（第 30 章）以及在生物医药（见 19.18 节），环境生物技术方面使用的遗传工程原核生物。

31.6 胰岛素的生产：生物技术商业化的开端

生物技术中最有经济价值的领域就是生产人类蛋白质（human protein）。许多来自哺乳动物细胞的蛋白质具有很高的药用价值。但这些蛋白质在正常的组织中含量很低，且纯化的成本很高。即使能够通过细胞培养（见 9.3 节）来生产这些蛋白质，也要比利用大规模的微生物发酵生产昂贵得多，困难得多。因此，在生物技术工业中，利用基因工程改造的微生物去生产这些蛋白质，一个经典的例子便是胰岛素，接下来将详细讨论。

胰岛素的生物学

胰岛素的生产是生物技术商业化成功的经典案例。许多激素都是小分子蛋白质，这些分子严密地控制着哺乳动物体内的新陈代谢，具有重要的治疗价值。胰岛素（insulin）是由胰腺产生的一种蛋白质，是调控体内葡萄糖代谢的重要物质。糖尿病（Juvenile diabetes）是胰岛素缺乏引起的一种疾病，困扰着几百万人（见 22.15 节），其标准的治疗方法是定期注射或口服胰岛素。

因为绝大多数哺乳类动物胰岛素的结构类似。以往，人们常常从牛、猪胰腺中提取胰岛素，来治疗人类糖尿病。但是，非人类的胰岛素并不像人类胰岛素那样有效，且制备过程昂贵而复杂。但在细菌中克隆人类胰岛素基因的方法解决了上述问题。最初，克隆和生产使用的菌株是大肠杆菌，但在今天绝大多数的基因工程胰岛素是在酵母菌中生产的。由生物合成的胰岛素在各方面都与纯化自人类胰腺的胰岛素相同。

作为一种小蛋白质，胰岛素是对生物技术产业的一个特别挑战。它的活性形式由两条多肽链组成（A 链和 B 链），两条链之间由二硫键连接（图 31.11a）。这两条多肽链是由一个胰岛素基因的两个独立的部分所编码的。该胰岛素基因所编码的“原胰岛素前体”（preinsulin）含有一段信号肽序列（与蛋白质的分泌有关）（见 7.17 节）、A 链和 B 链序列，以及一段在成熟的胰岛素中并不存在的连接多肽序列。原胰岛素前体经过加工形成了原胰岛素，而原胰岛素再经过蛋白酶的加工，切除 A 链和 B 链间的连接多肽序列后才形成了具有活性的胰岛素。

基因工程胰岛素

在细菌中生产人类胰岛素所依赖的某些原理，在前面已经讨论过了。因为胰岛素蛋白非常小，它的基因完全可以用人工合成而获得，从而省略了从人类 DNA 中克隆胰岛素基因的步骤及由原胰岛素前体到胰岛素的加工过程。A 链由 63 个碱基（对应 21 个氨基酸）编码而成，B 链由 90 个碱基（对应 30 个氨基酸）编码而成。在原胰岛素中，还有一条连接 A、B 两条链的由 105 个碱基编码而成的多肽链（图 31.11b）。当这条多核苷酸链合成时，我们还在两端加上了限制酶酶切位点以便将其连接到质粒载体上。

为了使其有效表达，合成的胰岛素基因被插入适当的大肠杆菌启动子的下游，在它的前端还加入了一个编码融合蛋白的基因序列（见 31.5 节）。这样做的原因是，在大肠杆菌中融合蛋白产物的稳定性要比单独的胰岛素产物高得多。最后，一个甲硫氨酸的密码子被加入到胰岛素编码基因和上游融合蛋白基因的连接处（图 31.11b）。这是因为化学物质溴化氰（cyanogen bromide）可以特异性地识别甲硫胺酸的位置并切割多肽链，利用这一特点，我们可以从融合蛋白中回收胰岛素产物。胰岛素蛋白本身缺乏甲硫胺酸，因此使用溴化氰并不会对胰岛素蛋白本身产生影响。

从细胞中分离的融合蛋白经过溴化氰的处理后得到了原胰岛素（图 31.11a），再通过酶处理将连接两条链的多肽序列除去，并促使二硫键的形成，则最终得到了成熟的胰岛素。这一过程是必需的，因为只有经过原胰岛素的自然折叠，才能使 A、B 两条链之间正确形成二硫键（图 31.11a）。我们可以使用化学物质来催化二硫键的形成，而一旦二硫键正确形成，就可以用胰蛋白酶和羧肽酶将两条链间的连接多肽切除，从而形成可

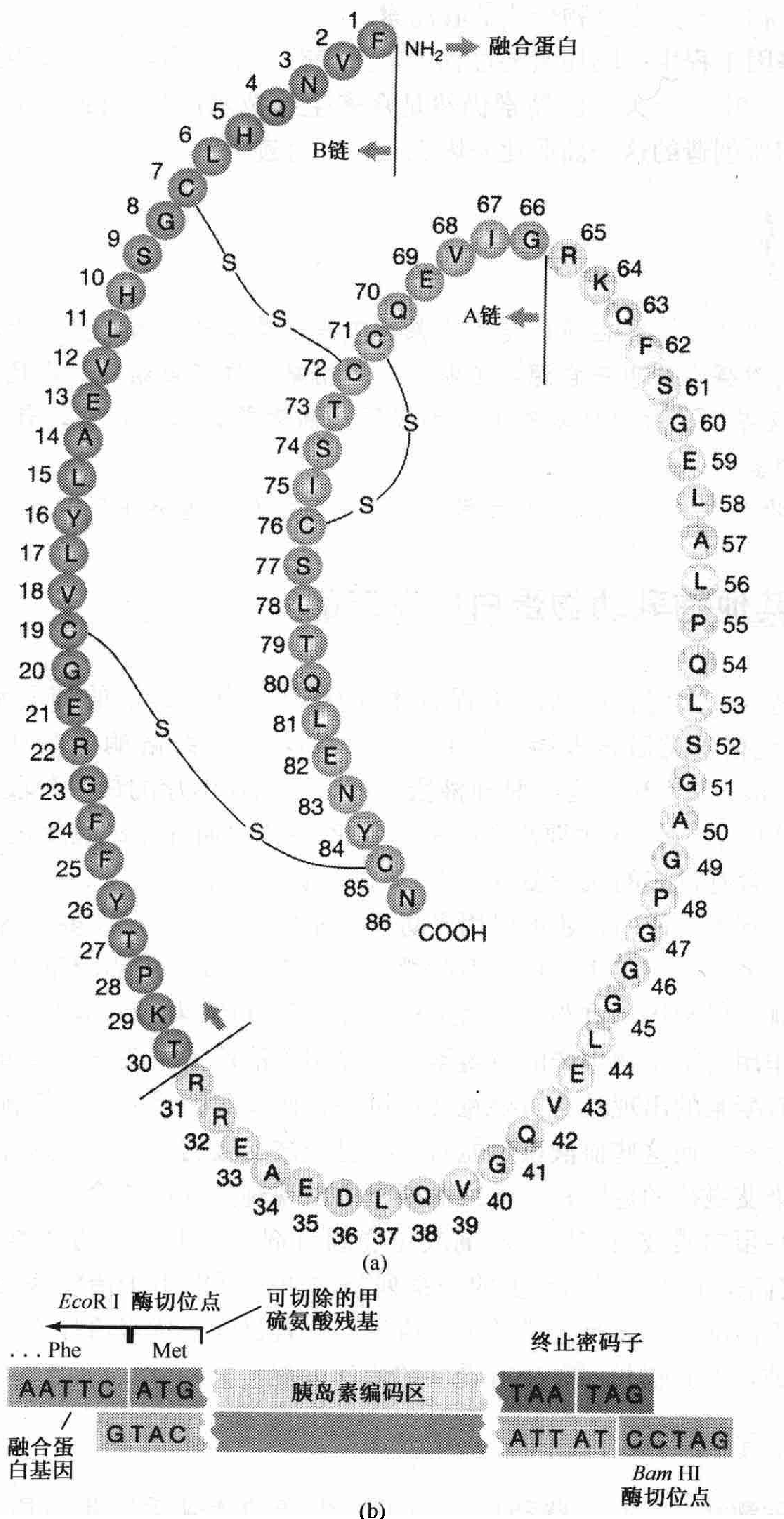


图 31.11　利用细菌生产人胰岛素的遗传工程。(a) 人胰岛素的结构。氨基酸名称使用了单字母缩写(图 3.12)。黄色所示的多肽是两条链之间的连接序列，在成熟的胰岛素形成前将被切除。(b) 胰岛素基因及各种接头的化学合成。合成的片段利用限制性内切核酸酶 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 的酶切位点连接到质粒载体之上（注意：*Eco*R Ⅰ 的位点也是编码区的一部分），并与载体上的一段基因形成融合基因（见 31.5 节）。加入了甲硫氨酸的编码序列，这样可以利用特异性识别甲硫氨酸位点的化合物溴化氰将 A 链和 B 链从融合蛋白上切下。两个终止子被加入到编码序列的下游结尾处用以确保翻译停止。

以使用的终产物——人工生物合成的胰岛素。

在利用基因工程生产胰岛素的过程中，人们获得了许多经验，这些经验又被应用到其他产品的生产中。今天，胰岛素仍然是众多生物技术产品中的一员，我们不得不惊叹，早期人们所创造的这一商业化基因工程的“奇迹”。

概念检查

最早商业化的人类蛋白质就是利用基因工程细菌生产人胰岛素。而在今天，其他众多的激素及人类蛋白质也正在源源不断地生产出来。许多重组疫苗也已经投入了生产。

◆ 为什么基因工程胰岛素省略了形成原胰岛素前体这一过程，却无法省略原胰岛素形成这一步骤?

◆ 在生物合成胰岛素的生产过程中，溴化氰起什么重要作用?

31.7 其他哺乳动物蛋白质及产品

除了胰岛素，人们利用基因工程技术还生产了许多其他的哺乳动物蛋白质（表31.1）。其中包括各类激素及凝血蛋白等。例如，组织纤溶酶原激活物（tissue plasminogen activator，TPA）是一种血液蛋白质，可以在治疗的最后阶段用于溶解并清除血液凝块。临床上，TPA 主要用于心脏病患者和其他循环系统衰竭的患者，因为这些患者的血液中含有过多的血液凝块。TPA 在心脏病、心脏支架、心脏移植及其他心外科治疗过程中有重要作用，还可以用来防止肺血栓的产生。在许多发达国家，特别是美国，每年有许多人因心脏病死亡，因此微生物生产的 TPA 的需求量很大。

血凝素Ⅶ、Ⅷ和Ⅸ是重要的基因工程产品。与 TPA 相反，这些蛋白质对血液凝块形成有重要作用。微生物生产的血凝素，可以用于治疗体内缺乏这些蛋白质而导致的血友病。重组血凝素的出现具有重要意义：过去，血友病的治疗必须依赖从大量人类血液中提取的血凝素，而这些血液很可能有一些已经被艾滋病毒污染，这样一来，血友病患者将面临感染艾滋病的危险；而重组血凝素的出现避免这一危险。

还有一些蛋白质被用作抗癌制剂或免疫调节剂。其中主要的一类就是干扰素（interfron)，它们是由动物细胞产生的一系列蛋白质，可以用于治疗病毒感染（见 23.10 节）或者用于激活对应某种感染的免疫应答。尽管目前干扰素治疗方法并没有在临床上取得重大突破，但其仍是一种很有希望的治疗试剂。

非血液蛋白质

除了各种激素，还有一些利用基因工程生产的哺乳动物蛋白质是各种酶类（表31.1)。例如，人类 DNA 酶Ⅰ被用于治疗囊性纤维化（cystic fibrosis）患者。这些患者的肺部被一种致命的细菌——铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）所感染，并在患处形成一种由 DNA 和多糖组成的胶体。由于这些细菌的细胞能够在患者肺部形成一种生物膜（见 19.3 节)，使得药物很难起作用，而 DNA 酶则能够将细菌细胞溶解时所释放的 DNA 降解。另一种称为藻酸盐溶解酶（alginate lyase）的蛋白质则能够将铜

绿假单胞菌产生的多糖分解，同细菌细胞溶解时所释放的 DNA 一样，这些多糖也是形成肺部胶结的物质之一，因此，它的水解可以减轻患者呼吸困难的症状。目前所知，仅在美国就有超过 30 000 囊性纤维化患者。用于治疗的 DNA 酶自 1994 年面世以来，销售额已累计超过一亿美元。

表 31.1 基因工程生产的一些治疗产品

产品名称	功 能
血液蛋白质	
红细胞生成素	治疗某些类型的贫血症
凝血因子Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ	促进凝血
组织纤溶酶原激活物	溶解血栓
尿激酶	血液凝集
人类激素	
表皮生长因子	促进创伤治疗
促卵泡激素释放因子	治疗生殖系统功能紊乱
胰岛素	治疗糖尿病
神经生长因子	用于治疗神经系统的退化、紊乱及麻痹
耻骨松弛激素	促进分娩
生长激素	治疗某些类型的生长缺陷及矮小症
免疫调节剂	
α-干扰素	抗病毒，抗肿瘤
β-干扰素	治疗多发性硬化综合征
群体刺激因子	治疗病毒感染及癌症
白细胞介素-2	治疗某些癌症
溶菌素	治疗炎症
肿瘤坏死因子	抗肿瘤，也可治疗关节炎
酶的替代物	
β-葡萄糖脑苷脂酶	治疗一种遗传性的神经系统疾病
治疗用酶	
人类 DNA 酶 Ⅰ	治疗囊性纤维化
藻酸盐溶解酶	治疗囊性纤维化

并不是所有基因工程生产的酶类都被用于医疗用途。许多商业化的酶类（见 30.9 节）也是用这种方法生产的。非人类激素也有各种产品面世，例如，在美国，利用重组技术生产的牛生长激素（bovine somatotropin）被用于增加牲畜的产奶量（转基因牲畜，见 31.9 节）。基因工程技术还常常能给人们带来意想不到的好处。被用来生产奶酪的凝乳酶（rennin）是由动物产生的，因此这样的奶酪受到严格的素食主义者的抵制，但在英国，人们利用微生物产生的重组凝乳酶来生产的“素食奶酪”已经上市，并被人们广泛接受。就进一步的应用来说，我们还可以利用定点突变技术（见 10.18 节）对现有的克隆基因进行改造，从而产生具有新特性的产物。除此之外，抗生素是由一系列酶

类作用下，在细胞内的生化途径中合成的（第 30 章），我们可以通过基因工程技术改造这些相关的酶类，以使其产生各种各样的、非自然但却具有临床疗效的新抗生素。

概念检查

过去，许多人类蛋白质产品非常昂贵，这是因为它们在人体组织内的含量很少，很难分离提取。而现在，通过克隆这些蛋白质的编码基因，并利用合适的表达载体，已经大量的生产这些极有价值的蛋白质。

◆ 比较 TPA 和血凝素Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ的异同。

◆ 解释 DNA 降解酶是如何作用于细菌感染的，请以囊性纤维化疾病为例来说明。

31.8 基因工程疫苗

疫苗实际上是一种被灭活或改造的致病微生物悬液（或者从这些微生物分离到的特定组分）。当疫苗被注射到动物体内后，就可以使机体产生针对某种疾病的免疫力（见 22.13 节和 22.14 节）。通常来说，能够引起免疫反应的物质多是那些外壳蛋白，如病毒的衣壳蛋白。基因工程技术也可以用于多种疫苗的生产（表 31.2）。

表 31.2　基因工程疫苗

疾病名称	致病微生物	疫苗功能
病毒性疾病		
甲型肝炎	甲型肝炎病毒(hepatitis A virus)	预防传染性肝炎(见 26.11 节)
乙型肝炎	乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)	预防血清型肝炎(见 16.15 节和 26.11 节)
麻疹	麻疹病毒(measles virus)	预防麻疹(见 26.7 节)
狂犬病	狂犬病毒(rabies virus)	预防狂犬病(见 27.1 节)
流行性感冒	流感病毒(influenza virus)	预防流感(见 26.8 节)
脊髓灰质炎	脊髓灰质炎病毒(polio virus)	预防脊髓灰质炎(见 16.8 节、25.9 节和 28.8 节)
细菌性疾病		
破伤风	破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)	预防破伤风(见 27.9 节)
白喉	白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)	预防白喉(见 26.3 节)
滴虫综合征	沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)	预防骨盆炎(见 26.13 节)
寄生虫疾病		
疟疾	间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)	预防疟疾(见 27.5 节)

重组疫苗

重组 DNA 技术可以用于病原体的改造。举例来说，某些情况下，可以将病原体

的、与致病性相关的基因“删除”而只保留那些能够引起免疫反应的部分，这称作重组弱毒力活体疫苗（recombinant live attenuated vaccine）。使用重组技术也可以在病毒中添加一个免疫某种病毒疾病的基因。例如，一种重组病毒疫苗可以使家禽对鸟痘（一种导致体重和产蛋量下降的病毒）和新城疫病毒（引起致死性病毒疾病）产生免疫力。鸟痘病毒是一种典型的痘疹病毒（见 16.13 节），我们将它的致病基因删除（但保留引起免疫反应的部分），然后将来自新城病毒的免疫诱导部分的基因加入，从而形成一个“多价疫苗”（polyvalent vaccine），这个新的“病毒”可以使机体同时获得针对两种病毒的免疫力。

“疫苗病毒”（vaccinia virus，见 16.12 节）是一种广泛用于制备人用活体重组疫苗的载体。这类病毒也被称作“载体疫苗”（vector vaccine）。载体病毒最初是被用作天花疫苗的，其本身对人类没有致病性。在疫苗病毒中进行克隆，则需要使用一种含有疫苗病毒胸苷激酶基因（图 31.12a）的大肠杆菌质粒。适当的外源 DNA（如编码病原体衣壳蛋白的基因）插入到质粒之中，然后重组质粒被转化到宿主细胞，该细胞内的胸苷激酶（thymidine kinase）基因已经失活且已被野生型的疫苗病毒感染（图 31.12b）。如果质粒 DNA 和疫苗病毒基因组 DNA 之间发生同源重组（图 31.12c），则重组之后的病毒体将含有失活的胸苷激酶基因。含有野生型胸苷激酶基因的病毒体的生长会受到 5-溴脱氧尿苷化合物的抑制。这样就可以在含有该抑制剂的培养基上筛选出重组的疫苗病毒（图 31.12d）。

尽管这样得到的重组病毒不再表达胸苷激酶，但它们仍能感染人类细胞并且表达所携带的外源基因。实际上，我们可以构建出含有多种病毒衣壳蛋白基因的重组疫苗病毒（即多价疫苗）。目前，多种牛痘载体疫苗被开发出并被批准用于兽医治疗，其中包括狂犬疫苗。许多人类亚单位疫苗也正处于临床试验阶段，一旦证实这些疫苗对人体无害，并且能在人体内具有高度的免疫原性，则可预见在未来几年中它们的使用范围将会越来越广阔。

亚单位疫苗

重组疫苗不需要包含整个致病生物体。亚单位疫苗（subunit vaccine）只含有致病生物体的某一部分特殊蛋白质。对病毒来说，这一部分特殊蛋白质常常是它的衣壳蛋白，因为这些衣壳蛋白通常具有很高的免疫原性（见 22.13 节）。纯化后的衣壳蛋白可以高剂量的使用，并且快速而高水平地引起免疫反应。目前，亚单位疫苗受到普遍欢迎，因为重组 DNA 技术允许生产大量的特异性蛋白质，并且这些蛋白质在纯化之后不会含有哪怕极其微量的致病生物体。

制备亚单位疫苗的步骤如下：利用限制性内切核酸酶得到病毒 DNA 的片段；将病毒衣壳蛋白基因克隆到适当的载体上；提供合适的启动子、可读框和核糖体结合位点；将构建好的基因在微生物体中表达。有时候，仅表达蛋白质的某个特殊的“结构域”（domain）会比表达整个蛋白质更有效果，这是因为免疫细胞及抗体通常只与蛋白质的某个很小的部分发生反应（见 22.5 节）。

当使用大肠杆菌作为克隆宿主时，亚单位疫苗的免疫原性急剧下降，甚至无法起到预防病毒感染的作用。其中的问题在于，当病毒在动物细胞体内进行复制时，其衣壳蛋

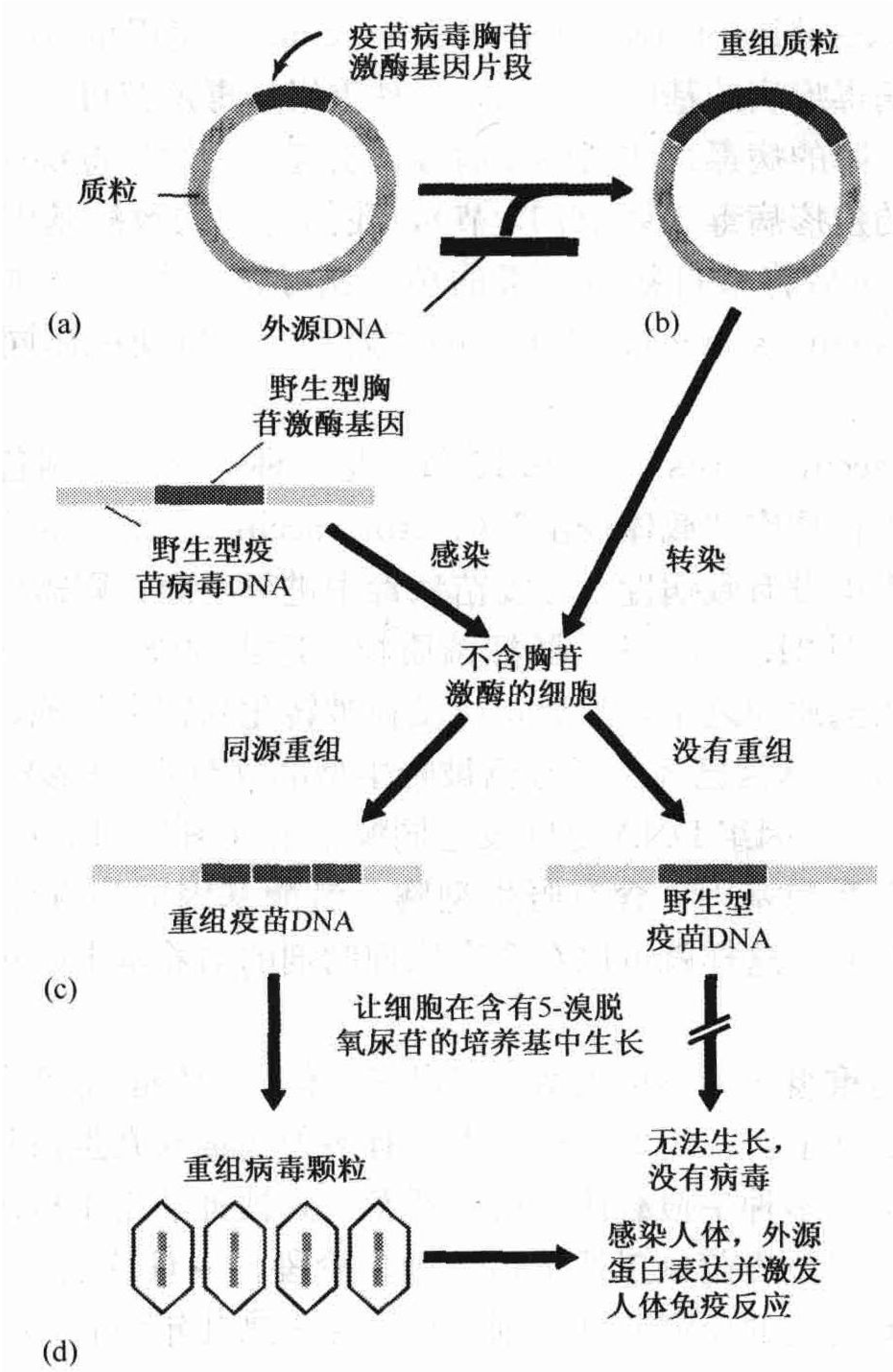


图 31.12 用作重组疫苗的病毒的产生过程。(a) 外源基因被克隆到含有小片段疫苗病毒胸苷激酶基因的质粒中。(b) 重组质粒形成。(c) 重组质粒被转染到已经感染了野生型疫苗病毒的宿主细胞中。一旦同源重组发生，就可以生产重组疫苗 DNA。(d) 将细胞置于含有5-溴脱氧尿苷化合物的条件下培养。该化合物对含有野生型胸苷激酶基因的细胞有毒。只有重组病毒体才可能在这种条件下繁殖。如果重组疫苗病毒含有其他病毒的衣壳蛋白基因，这些基因将得到表达。

白都必须经过转录后加工（posttranslationally modified)，通常是在蛋白质上加一糖类基团，称为糖基化（glycosylation)。糖基化是蛋白质产生免疫原性的必要条件，而在细菌中产生的重组蛋白质却缺少了这一加工过程。为了解决这一问题，人们使用了一种真核生物载体。第一个用于人体的亚单位疫苗就是在酵母中克隆表达的，如乙型肝炎病毒的表面蛋白质，这些蛋白质形成的聚合体与那些在被感染的患者体内所发现的非常相似，这些聚合体纯化后可以有效地预防乙肝病毒的感染。

利用基因工程技术，大量针对各种病毒及致病生物体的亚单位疫苗被开发出来。昆虫细胞和人工培养的动物细胞也常被用于制备重组疫苗。为了使表达的蛋白质能够正确地糖基化或经过其他加工，使用与人类细胞相近的宿主是非常重要的。同时，各种植物

也可以用于生产疫苗（见 31.10 节），因为它们也是真核生物，也同样可以对表达的蛋白质进行正确的糖基化。

重组疫苗的前景

总而言之，基因工程重组疫苗的使用将会越来越普遍。首先，它们比普通的弱毒力或灭活疫苗更安全，决不会传播疾病；其次，它们有着再生性，因为随时可以监控这些相关的基因组；第三，重组疫苗可以高剂量地使用而不用担心会有副作用。

此外，重组疫苗的制备速度比传统方法要快。对某些疾病（如流感）来说，时间就是生命。利用克隆的流感病毒红细胞凝聚素基因（见 16.9 节），人们可以在两三个月内生产出针对流感病毒的重组疫苗。相对于需要 6～9 个月才能生产出来的弱毒疫苗来说，时间缩短了很多。对那些由于新病毒的出现而导致的暴发性流行疾病来说，疫苗制备时间的长短是控制病毒流行的一个非常重要的因素（见 26.8 节）。最后，重组疫苗要比那些常规方法制备的疫苗成本低，售价便宜，这对今天的卫生保健工作来说，也是一个很重要的因素。

DNA 疫苗

在与多种传染性疾病的对抗中，尽管重组疫苗与普通疫苗都取得了相当大的成功，但在某些情况下，疫苗的制造仍然存在困难。对于目前最重要的两种疾病——疟疾（见 27.5 节）和艾滋病（见 26.14 节）来说，“标准”的基因工程技术也许能够制造出有效的疫苗，但目前进展缓慢。在等待这方面的突破时，一个崭新的方向已被打开——DNA 疫苗（DNA vaccine），也称作基因疫苗（genetic vaccine）。

DNA 疫苗是利用病原生物自身的遗传物质去免疫个体。这里的遗传物质可以是病原生物的基因组，也可以是某些编码免疫原性蛋白质的特定基因。这些关键基因被克隆到质粒或者病毒载体上，然后注射到体内。当这些 DNA 被动物细胞接纳后，有可能被降解，也有可能被转录和翻译，如果是后者，则会产生具有免疫原性的蛋白质，并使机体获得针对病原体的免疫力。因此，DNA 疫苗实际上是通过疫苗 DNA 所编码的蛋白质使机体获得免疫，而并非 DNA 本身具有免疫原性。

相当多的 DNA 疫苗正在进行临床试验，还有更多同类产品正在开发中。DNA 疫苗的优点是既安全又便宜。与病毒疫苗不同，DNA 疫苗不会被宿主免疫系统所发现，因为核酸物质本身的免疫原性是非常低的，这可以防止机体产生自体免疫反应，避免抗体和免疫细胞攻击自身组分（见 22.15 节）。

概念检查

许多重组疫苗已经生产出来。其中包括活体重组疫苗、载体疫苗、亚单位疫苗和 DNA 疫苗。

- 为什么重组疫苗比一些常规方法生产的疫苗要安全?
- 重组活体弱毒疫苗、载体疫苗、亚单位疫苗和 DNA 疫苗之间的区别是什么?

31.9 基因工程在动物及人类遗传学中的应用

本节只涵盖了基因工程在动物和人类遗传学应用中的几个主要方面。这些应用实例中，有一些是为了生产某种产品，但更多的是为了研究哺乳动物中的基因功能以及治疗或预防遗传疾病。

转基因动物

利用重组 DNA 技术和显微注射技术使克隆基因进入受精卵，许多外源基因已经在实验动物和一些具有重要商业价值的动物体中得到表达。这些动物因为能够永久呈现外源基因所赋予的性状而被称为转基因动物（transgenic organism)。转基因动物在基因调控、进化生物学等基础生物医学研究中发挥着越来越重要的作用。为研究目的或商业目的生产转基因动物，将成为生物技术中的重要领域。

就像转基因植物在农业中的应用一样，转基因动物的一个重要应用就是提高动物的产量或对某种疾病的抗性。转基因动物还可以用于生产具有药用价值的蛋白质，这一过程被称为动物制药（pharming)。在生产那些需要翻译后加工的人体蛋白质时，转基因动物也发挥着重要作用，比如凝血酶以及许多类似的、在微生物及植物宿主中无法生产的蛋白质。还有一些蛋白质被设计为高水平地分泌到动物乳汁中，这样我们就能很方便的对其进行大量的提取和加工。这其中包括有产自绵羊的 α-1-抗胰岛素（α-1-antitrypsin，用于治疗肺部疾病）和产自山羊的组织纤溶酶原激活物（tissue plasminogen activator，用于溶解血液凝块，见 31.7 节)。

人类遗传学

传统的遗传学，包括基因杂交或诱变，都不适于在人体中进行研究。因此，进入基因工程时代之前，对人类遗传学的了解远远落后于对其他生物体的了解。然而，重组 DNA 技术在人类遗传学研究领域展现出巨大价值，特别是在鉴别及医学方面。

第 15 章曾经提到，人类基因组序列的图谱已在 2000 年对全世界公布。有了这张图谱，基因工程技术可以广泛地用于个体鉴别领域，这一技术称为 DNA 指纹（DNA finger printing，见知识窗：DNA 指纹)。然而，对人类基因组进行测序的主要目的是为了更好地了解人类的遗传疾病，从而在可能的范围内更有效地对人类遗传病或其他疾病进行治疗。

目前人们已经了解了大量的人类遗传病。通过重组 DNA 技术，并结合传统的遗传学研究方法（跟踪家族遗传病史等方法)，已经能够定位那些有缺陷的染色体，甚至能够知道缺陷发生在染色体的哪个部位。采用重组 DNA 技术，可以克隆含有遗传缺陷的区域，并且可以比较正常基因和缺陷基因之间在碱基序列上的差异。通过这些研究，即使缺乏对酶缺陷的了解，我们仍能在基因层面上获得有用的信息。很多基因，包括亨丁顿氏舞蹈症（Huntington's disease)，A 型和 B 型血友病（hemophilia)，囊性纤维化（cystic fibrosis)，迪谢内肌营养不良症（Duchenne's muscular dystrophy)，多发性硬化症（multiple sclerosis）及乳腺癌（breast cancer）等，都已经利用这些技术定位了致病基因的位置并且已经了解了是何种突变导致了基因的缺陷。既然如此，将如何利用基因

工程来治疗这些疾病呢?

基因治疗

如癌症治疗一样，基因工程已经被用于治疗某些人类遗传病。这种治疗方法称为基因治疗（gene therapy）。在基因治疗中，我们将利用正常的功能基因去替代或修正那些失去机能或机能不良的基因。这种方法的关键在于正确地定位目标细胞，而且成功转染的细胞系能够持久保持基因修正功能。

重度综合免疫缺陷病（severe combined immune deficiency，SCID）最先被作为基因治疗的病例。这种疾病是由腺苷脱氨酶（adenosine deaminase，ADA）缺失引起。这种酶与骨髓细胞中的嘌呤代谢有关，它的缺失将导致免疫系统的重大缺损。针对该疾病的基因治疗过程是：利用反转录病毒作为载体，将正常的 ADA 基因插入来自患者的 T 淋巴细胞（这些细胞是免疫系统的重要组成部分；见 22.1 节），然后将这些“正确”的淋巴细胞重新导回患者体内（在作为载体的反转录病毒上携带有新霉素抗性基因作为选择标记，以便筛选）。但由于 T 淋巴细胞的寿命有限，患者每隔 1～2 个月就需要重复治疗一次。因此，人们尝试将 ADA 基因插入骨髓干细胞中（该细胞能够不停地进行分裂增殖，见 22.1 节）从而取得真正有效的疗效。目前，至少在一种 SCID 治疗中，基因治疗取得了成功。

其他使用不同病毒作为载体的基因治疗方法也正在试验当中，并已取得不同程度的成功。但从 1990 年第一个将基因治疗用于治疗 ADA 的试验开始，一直到 2000 年，研究者们在这一领域并没有取得实际应用方面的突破。在由不同基因引起的其他类型的 SCID 疾病治疗中，仅有 3 例患者被成功治愈。看来，目前在此类疾病的治疗中，基因治疗方法只对极少数类型的病症有效。

尽管基因治疗有着巨大的实用潜力，但目前的研究离实际应用还有很大一段距离，其中一些难点问题与目前使用的载体有关。尽管使用反转录病毒作为载体能够得到稳定的整合基因，但基因插入的位置却是不可预测的，此外克隆 DNA 的数量受到限制，且克隆基因的表达也是短暂的。反转录病毒载体的感染力也有限，在宿主中很快便失去活力。许多非反转录病毒载体，如腺病毒载体（见 16.14 节）也存在同样的问题，并且这类载体所带来的有害反应也是一个严重的问题。虽然现状不容乐观，但一些新载体的出现，如人类人工染色体以及经过改造的各类 HIV 病毒（见 9.13 节和 16.15 节），仍给基因治疗带来了新的希望。

应该注意的是，在基因治疗过程中，缺陷的基因并没有被替换掉，而是反转录病毒（携带着正常基因）在某处整合进这些细胞的染色体。以某些哺乳动物的种系细胞（产生配子的细胞）进行实验，会获得真正的基因取代，但用于分离带有这些变化的动物个体的技术是难以用于人类的。试图改变人类的生殖细胞不仅是实验方案的问题，还会带来许多伦理和社会问题。

概念检查

基因工程可用于开发转基因动物，从而生产那些具有药用价值的蛋白质。同时，基

因工程技术还可以应用到个体鉴定的DNA指纹技术中。而在基因治疗中，目的是将健康的功能基因导入人体从而治愈人类的遗传疾病，基因工程将是达到这一目的的最大希望。

◆ 什么是生物制药?

◆ 什么是VNTR?

◆ 被基因疗法成功治愈的患者依然含有缺陷基因的拷贝，请解释。

知识窗：DNA指纹分析

分子遗传学和基因工程中的一些技术，可以用来确定相近生物甚至是人类个体间的相互关系，这一技术称之为DNA指纹分析（DNA fingerprinting）。

高等生物体存在着不同数量及不同形式的DNA序列重复，这一现象为DNA指纹分析提供了可能性。高等真核生物的基因组中含有大量的重复DNA，它们以家族相关序列的方式分布于整个基因组上，这些家族的成员有些已被克隆和测序。一个家族的重复序列，其序列本身有独特性，该序列在特定染色体的单一位点上的重复次数是不同的，这些序列称为串联重复序列可变数（variable number of tandem repeat，VNTR），有些序列已得到确认。

利用VNTR进行DNA指纹分析的过程见图1a。图中显示一种真核生物染色体上的两对不同的等位基因（即不同形式的同一基因），其重复序列的拷贝数不同。由于已经对VNTR DNA测序，因此可以确定其中缺少哪种限制酶的切点，使用这种酶切割，将可以得到完整的VNTR。由于两条染色体上这一序列的重复次数不同，所得到的酶切片段的大小也就不同，这种不同称之为限制性片段长度多样性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）。然后可利用凝胶电泳将不同大小的DNA片段分开，其中带有VNTR的片段可用Southern印迹法检测（见7.7节），所用探针来自克隆的VNTR序列。即使在一个家族中存在多个等位基因（不仅仅是例子中所提到的两个等位基因），仅仅通过一个位点的不同来确认某个个体也是不精确的。因为同一家族的许多个体都有可能在同一位点拥有相同的片段。但是可以在检测DNA片段的同时，使用若干不同VNTR的标记物。利用上述方法比较两个不同的DNA样品，这样来鉴定不同个体的可能性就非常高了。

利用聚合酶链反应（PCR）可以简化鉴定过程。DNA指纹分析本身不一定要使用PCR，但当所分析的样品中DNA含量极少时，如来自一根头发的细胞样品，PCR则是必需的工具。除了得到足量的DNA样品外，PCR还可以直接用于DNA指纹分析（图1b）。要使用PCR方法，必须要知道VNTR两端的DNA序列，这样才能合成相应的引物。PCR仅扩增两个引物之间的DNA，因此电泳前我们不必对PCR产物进行酶切。如果PCR反应循环次数足够多，我们便可以直接通过凝胶染色来检测扩增到的DNA，而不必使用探针杂交。DNA条带在凝胶中的位置取决于它们的大小（即重复数）。只要检测足够多的不同VNTR，任何个体所特有的片段都可以被找到。

对高等生物来说，VNTR是无限制的。炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）是一种能引起炭疽病的细菌，其基因组中含有多种不同的VNTR。当该菌株被作为生物武器（见25.11节和25.13节）使用时，可以很容易地被鉴定和追踪。这些鉴定和追踪的结果可以帮助执法人员找到炭疽芽孢杆菌的来源，或者在法庭上作为生物恐怖事件中的菌种证据。

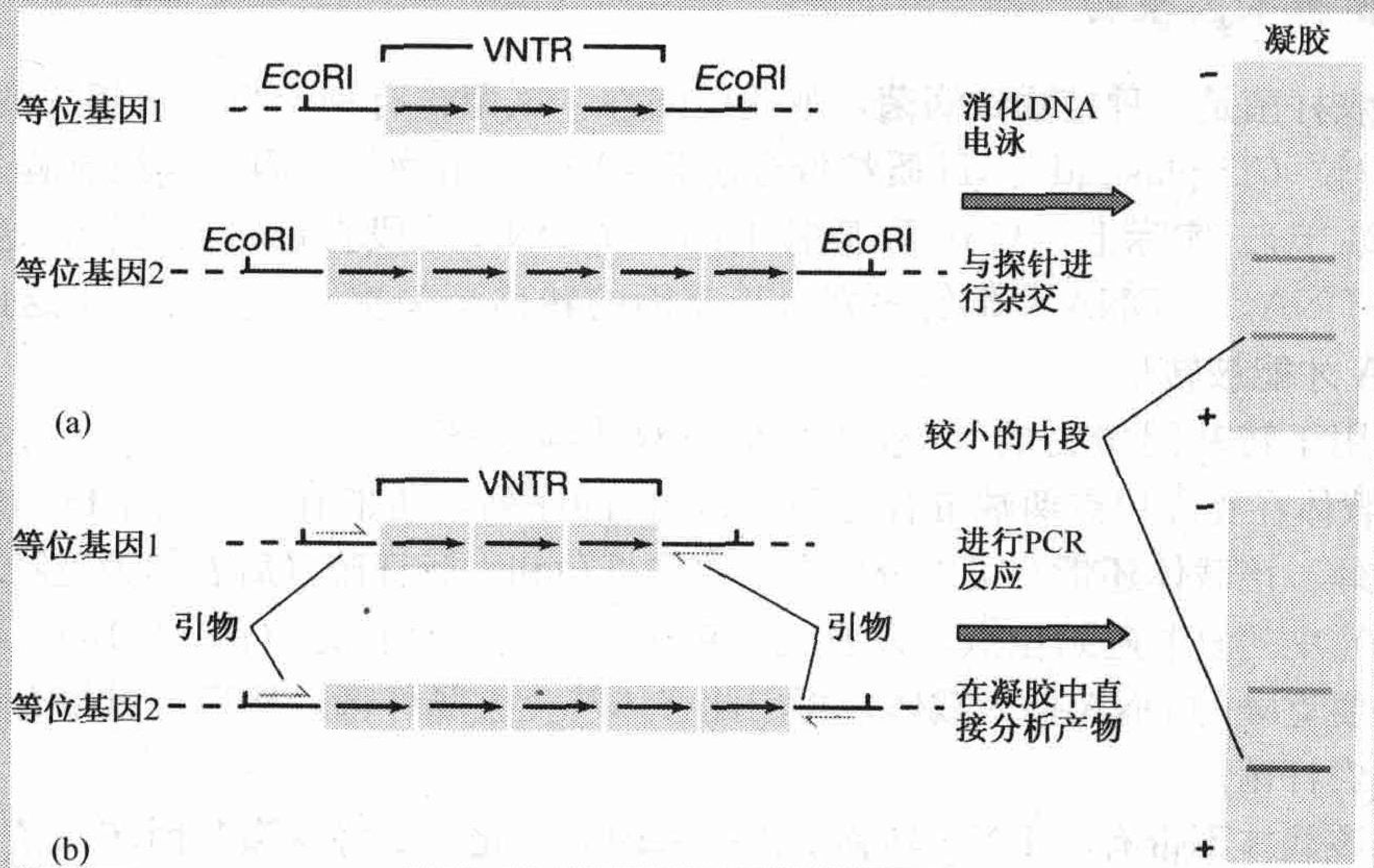


图1 DNA指纹分析。（a）同一染色体同一区域上的两个不同的等位基因。它们仅在VNTR的重复数目上不同。从含有这些染色体的细胞中分离DNA，用*Eco*RⅠ进行酶切（该酶在VNTR内没有酶切位点），电泳分离所得片段，（在凝胶中小片段比大片段移动的距离更远），然后用特异识别VNTR的探针进行Southern印迹杂交便可以鉴别出带有VNTR的片段。为了简明扼要地进行说明，图中显示的个体其两条染色体在这一位置具有不同的等位基因。而如果一个个体在这两条染色体上含有相同的等位基因，那么在结果中将只能观察到一条电泳带。（b）与（a）相同的等位基因，但采用PCR扩增VNTR片段，其产物不需酶切可直接电泳。

31.10 基因工程在作物中的应用：转基因植物

用传统方法对植物进行遗传改良是一项缓慢而艰难的工作，而重组DNA技术给这一领域带来了革命性的变化。人们已经能够利用基因工程技术改变植物DNA并用电穿孔法或基因枪法将其转化进植物细胞（见31.2节）。此外，还可以使用来自根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的载体将DNA直接转入某些植物（见19.21节）。通过植物组织培养技术可以筛选出利用体外技术改变了遗传性状的植物细胞克隆，经过适当处理可以诱导这些细胞长成完整的、可以繁殖后代的植物体。

相对于利用传统遗传学改良性状的植物而言，基因工程植物是“转基因”的

(transgenic)。公众将这些植物称为遗传修饰（genetically modified，GM）植物。尽管应用于转基因植物或转基因动物（见31.9节）的技术同那些应用于表达外源蛋白质的微生物相似，但前者的“转基因”却限定于多细胞生物体。在这一节中，我们将看到外源基因，称为转基因（transgene），插入植物基因组的过程以及转基因植物的用途。

Ti质粒和转基因植物

根癌农杆菌是一种植物致病菌，革兰氏阴性。该菌含有一个与毒力相关的大质粒，称为Ti质粒（Ti plasmid）。Ti质粒带有使DNA转入植物的基因（详细过程及遗传现象见19.21节）。实际上，只有Ti质粒上的一个DNA片段真正转入植物，这段DNA称之为T-DNA。T-DNA两端的序列对于基因的转移至关重要，只有处于这两序列之间的DNA才能被转移。

通常用于转基因植物的Ti载体系统是双质粒系统，称为二元载体（binary vector)。此载体在克隆位点两端带有T-DNA两侧的序列，还带有一个用于植物的抗生素标记。此外，该载体还带有可以分别在根癌农杆菌和大肠杆菌（后者作为克隆工作中的一个宿主）中的复制起始位点，以及在细菌中表达的抗性标记（图31.13)。在克隆过程中，将要克隆的DNA插入载体，再用此载体转化大肠杆菌，然后通过接合转移将其转入根癌农杆菌。

由于该载体不带有T-DNA转移所需的基因，因此，要将克隆基因转入植物，在用作宿主的根癌农杆菌内必须含有二元载体系统中的另一个成员。另外一个质粒含有Ti质粒的毒力区域，但通过人工改造去除了致病基因，虽然它能够使克隆DNA转入植物，却并不会导致植物患病。因此，这种质粒被称为非致瘤（disarmed）质粒，简称D-Ti，它提供了T-DNA转移所需的全部基因。载体上的克隆DNA和卡那霉素抗性标记可以被D-Ti诱动并转入植物细胞中（图31.13)。在与宿主染色体重组后，外源DNA可以被表达并赋予植物体新的特性。

利用根癌农杆菌人们已成功地获得了许多转基因植物。其中大部分属于草本（双子叶）植物，如番茄、马铃薯、烟草、大豆、苜蓿和棉花。另外，根癌农杆菌也可用于获得木本双子叶植物的转基因品种，如胡桃和苹果。然而用这种菌很难得到禾本科（单子叶）植物的转基因品种，但用其他方法如基因枪法（见31.2节）可以取得较好的效果。

对除草剂和害虫的抗性

除了增加产量之外，基因改良的目的还在于增加植物对除草剂、害虫及微生物疾病的抵抗能力。近几年来，研究者们已针对30多种不同的植物进行了上千种不同的田间试验。1992年，烟草成为中国第一种大规模种植的遗传修饰（GM）作物。到2000年为止，世界范围内已有超过1亿英亩（4400万hm^2）的GM农作物被种植，其中，58%为大豆，23%为玉米，12%为棉花，还有6%为油菜。几乎所有这些GM大豆和油菜都具有除草剂抗性，而玉米和棉花则具有除草剂抗性或病虫害抗性，或二者兼有。

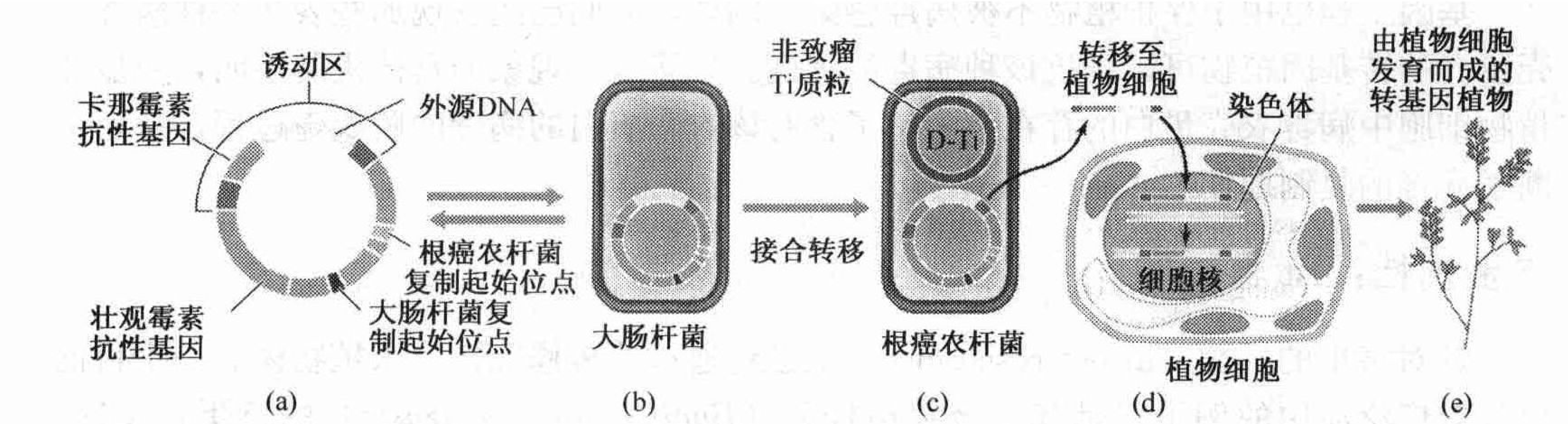


图 31.13　利用根癌农杆菌二元载体系统构建转基因植物。（a）常见的植物克隆载体带有 T-DNA 的两端序列（红色表示），外源 DNA（黄色表示），在大肠杆菌和根癌农杆菌中均有活性的复制起始位点（紫色表示），壮观霉素和卡那霉素的抗性标记。（b）载体首先被克隆进大肠杆菌，再通过接合转移进入根癌农杆菌。（c）农杆菌菌体中的 Ti 质粒（D-Ti）可协助载体进入植物，其本身的致病基因已经被去除。（d）D-Ti 可以诱动载体上的 T-DNA 区基因进入组织培养的植物细胞。由重组细胞可以发育成为完整的植株。DNA 由根癌农杆菌向植物转移的详细过程可以参见 19.21 节和图 19.55～图 19.57。

通过基因工程将除草剂抗性（herbicide resistance）引入植物体内是为了防止这些农作物被有毒的化学物质杀死。许多除草剂会抑制植物生长所必需的一种关键酶或蛋白质。例如，除草剂草甘膦（glyphosate）就是通过抑制一种酶的活性来杀死植物，而这种酶正是植物体合成芳香族氨基酸所必需的。这类除草剂无差别地将杂草和农作物一起杀死，因此必须被用作“发芽前除草剂”，即只能在植物种子发芽出土前使用。但是某些细菌体内天生含有一种可以抵抗草甘膦的酶。来自土壤农杆菌的、编码这一抗性酶的基因已经被克隆，经过改造后转入多种重要的农作物，如大豆等。在被喷洒了草甘膦后，含有这种细菌基因的植物长势和未喷洒草甘膦的对照植物的长势一样良好（图 31.14）。现在，具有除草剂抗性的大豆已经在美国境内广泛种植。

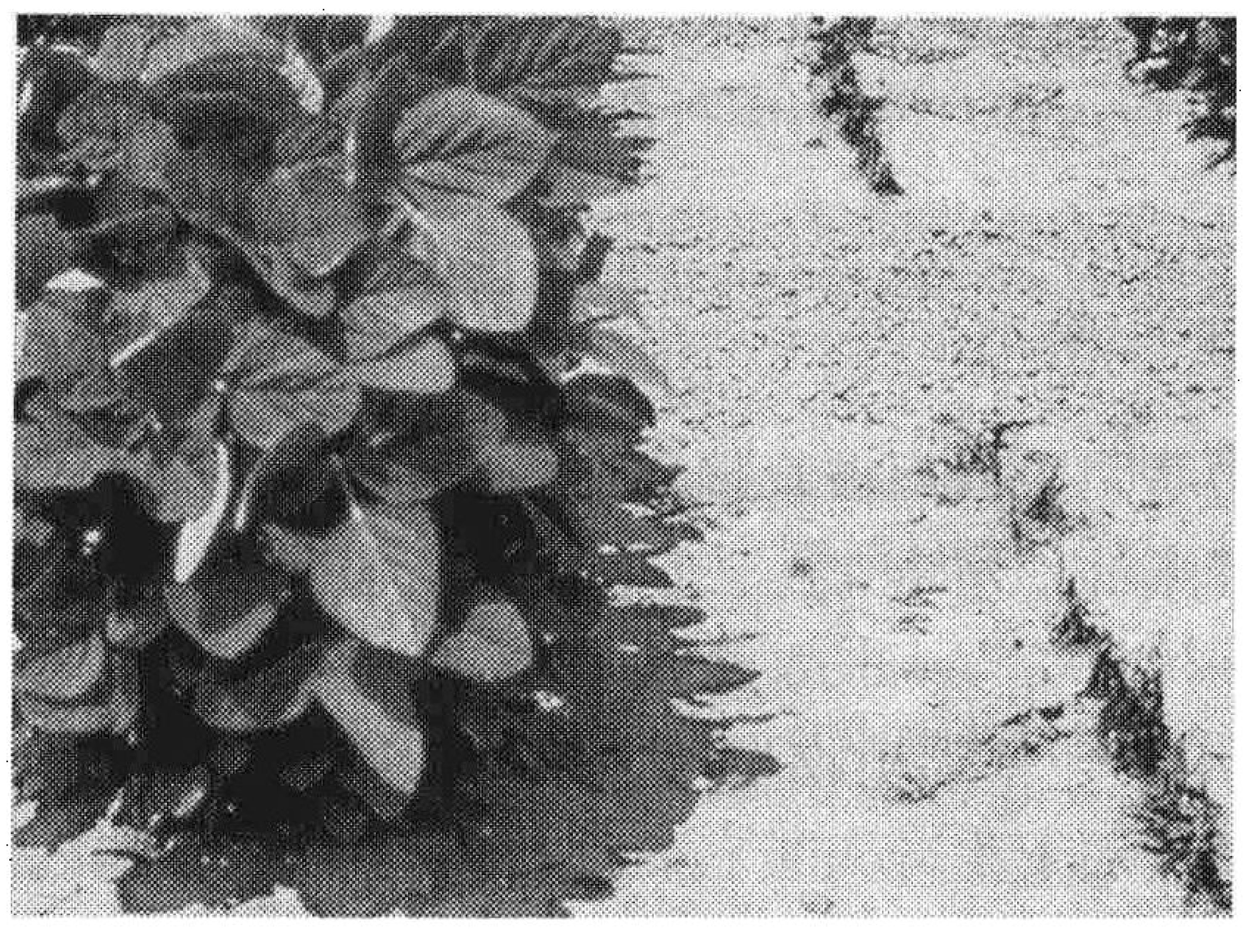


图 31.14　转基因植物的除草剂抗性。图中显示了大田中喷洒 Monsanto 生产的草甘膦后大豆的生长状况。右边示正常的大豆，左边是经过遗传修饰、具有草甘膦抗性的大豆。

基因工程也用于保护植物不被病毒感染。例如，人们已经发现那些表达某种病毒衣壳蛋白的转基因植物可以抵抗该种病毒的感染。虽然这一现象的具体机制不明，但显然植物细胞中病毒衣壳蛋白的存在，干扰了含有该衣壳蛋白的病毒的脱衣壳过程，从而中断了病毒的复制周期。

害虫抗性：Bt 毒素

针对害虫的抗性（insect resistance）也已经通过遗传修饰被引入植物体。一个目前已经被广泛应用的例子就是苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）的毒蛋白基因。这种微生物产生一种称为 Bt 毒素（Bt-toxin）的晶体蛋白（见 12.20 节）。这种蛋白质对蛾和蝶的幼虫有毒。此外，某些苏云金杆菌还可产生对甲虫、蝇及蚊的幼虫有毒性的蛋白质。

生物技术学家正采用不同的方法来加强 Bt 毒素在控制害虫方面的作用。其中一种方法是构建一种对多种害虫有效的单一 Bt 毒素。这一点之所以可以做到是因为 Bt 毒素中含有不同的结构域，这些结构域分别与杀虫特异性和毒性功能有关。在所有 Bt 毒素中，毒性结构域是高度保守的。基因工程学家正致力于构建一个基因，使其编码的 Bt 毒素带有一个毒性结构域和多个不同的杀虫特异性结构域，从而使其能够产生一系列毒素，应用于不同的植物害虫。

一种更有效地维持转入基因表达和稳定的方法就是将毒素基因直接转入植物基因组中。例如，人们已将一种天然 Bt 毒素基因插入一个质粒载体，使其受控于一个叶绿体 rRNA 启动子，用粒子轰击法（见 31.2 节）将质粒打入烟草的叶绿体中。通过这种方法已使一些植物获得了毒蛋白基因并进行了表达，这些蛋白质对多种害虫的幼虫十分有效且表达水平很高（图 31.15）。

尽管最初看起来转基因 Bt 毒素取得了很大的成功，但已经有报道表明，有些害虫已经对 Bt 毒素产生了抗性。对杀虫剂和除草剂的抗性是农业中的一个普遍问题，利用基因工程开发的产品也不能避免这一问题。这就意味着必须采用多种方法来进行害虫防治，Bt 毒素只是生物技术学家采用的诸多方法中的一种，尽管如此，Bt 毒素抗性农作物仍然在美国广泛种植。

植物生物技术的其他用途

并不是所有的植物基因工程都被直接用于植物疾病的防治。它还被用于制造各种各样的具备消费者喜爱特点的 GM 植物。如最早在美国市场出售的 GM 食品是一种延长了保鲜期的番茄。这一优点可以延长蔬菜的货架期。此外，与微生物（见 31.6 节）及动物（见 31.9 节）相同，转基因植物也可以用于生产具有商业价值或药用价值的产品，例如，烟草和番茄已经被用于生产人蛋白质干扰素等多种类型产品的农作物。同时，转基因农作物还可以用于廉价而高效地生产各种人工抗体。这些被统称为“植物抗体”的抗体产品，很有可能成为抗癌或抗病毒的新型药物，其中一些已经进行了临床试验。植物体之所以能够在这些产品的生产中发挥巨大作用，一个原因是它们能够对蛋白质进行正确的加工修饰，另一个原因就是农作物能够大面积地种植和收割。

农作物也可以用来生产疫苗。例如，人们已经构建了一种重组烟草花叶病毒（见

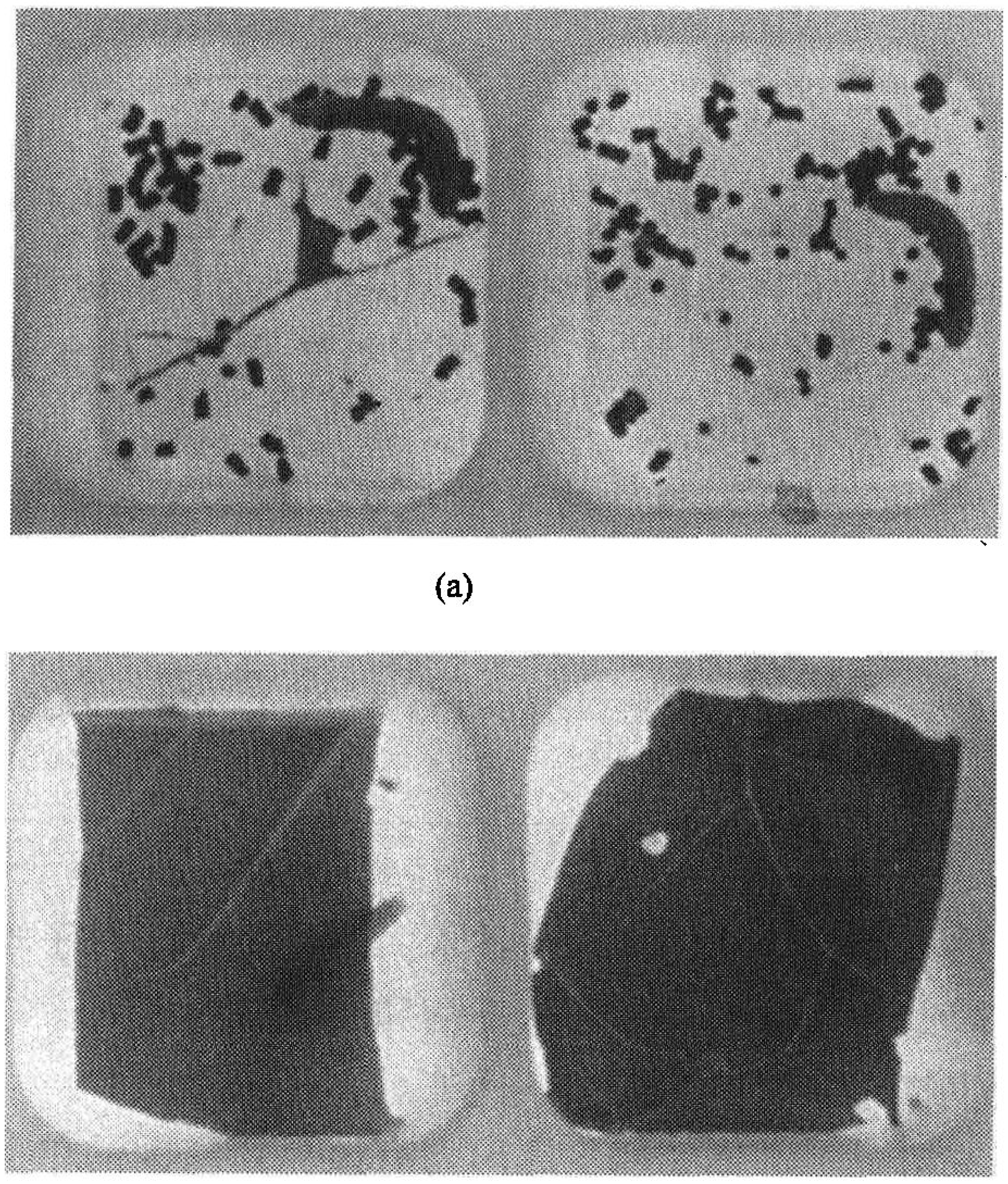

(a)
(b)

图 31.15　转基因植物对害虫的抗性。利用两种不同的叶片测定甜菜夜蛾幼虫对烟草的危害作用。(a) 使用来自普通植株的叶片。(b) 使用来自转基因植株的叶片，该植株在其叶绿体中表达了 Bt 毒素。

16.7 节)，它的衣壳中含有间日疟原虫（*Plasmodium vivax*，可导致疟疾，见 27.5 节）的抗原。利用这种重组病毒感染烟草或番茄后，我们只需要收割这些植物便能大量而廉价地得到疟疾疫苗。另一种新方法是在可食用的植物中生产疫苗。这种可食用疫苗（edible vaccine）目前已经在研制中，它可以使人们获得由肠道细菌引起疾病（如霍乱和痢疾等）的免疫性（见 28.5 节）。

在美国，尽管公众对于 GM 农作物的接受度很高，但到目前为止，GM 谷物仍只被批准作为动物食物来使用，且有不少人担心这些 GM 谷物会对人类食品造成污染。而在欧洲，人们对 GM 产品仍有相当大的疑虑和担忧，为此，一些欧洲国家已经强制禁止 GM 农作物的种植和进口。而那些没有禁止 GM 食品的国家也已经立法，要求所有的 GM 食品必须用标签示明。这一现状说明，先进的科学技术和潜在的商业价值都不能保证公众对 GM 农产品的接受。

由于公众日益增长的疑虑，近年来，美国各种 GM 农作物的种植面积已成稳定状态，不再增长。人们关注的焦点始终围绕着两个方面，即外源基因的摄入是否会对人体或动物产生副作用；存在于转基因植物中的人工基因是否会污染自然界中正常的植物。目前还没有证据证明 GM 农作物存在上述问题，但这些担忧不无道理；担忧的存在限制了转基因植物市场化的速度，这未尝不是一件好事。

概念检查

基因工程正被计划用于疾病的防治、产量的提高和以农作物为来源的重组蛋白质和疫苗的生产。一种普遍用于植物的克隆载体是来自根癌农杆菌的Ti质粒，该质粒能将DNA转入植物细胞。某些商业化的植物，其基因组经过了体外遗传技术的改造，这类植物被称为GM（遗传修饰）生物。

◆ 利用Ti质粒将DNA转入植物的过程与哪一类细菌基因的转移过程最为相似(第10章)?

◆ 什么是转基因植物?

复习题

1. 基因工程依赖于许多不同的体外遗传学技术。请描述用于分子克隆的各项技术。描述中要包括“克隆载体、限制性内切核酸酶和转化”等术语。(见31.1节)
2. 请描述两种原核生物克隆载体并说明其优缺点。(见31.2节)
3. 在已知基因序列的情况下，你如何检测出含有该克隆基因的单菌落？在不知道基因序列，但能够获得该基因编码的纯化蛋白质的情况下，又有何办法进行检测？(见31.3节)
4. 叙述表达载体、穿梭载体和整合载体之间的异同。(见31.4节)
5. T7噬菌体如何用于大肠杆菌外源基因的表达？其调控系统有何优点？(见31.4节)
6. 请解释，在大规模生产蛋白质的过程中，为什么要有调控开关？(见31.5节)
7. 第一个成功的商业化生物技术产品是什么？该产品的基因是如何得到的？(见31.6节)
8. 什么是亚单位疫苗？为什么在针对病毒病原体的免疫过程中，亚单位疫苗比弱毒疫苗更加安全？(见31.7节)
9. 基因工程如何用于囊性纤维化的治疗？(见31.8节)
10. 转基因动、植物与改变常规饲养方法的动、植物有什么区别？(见31.9节)
11. 什么是Ti质粒？它在基因工程中有何用途？(见31.10节)

应用题

1. 假设你要构建一个用于工业微生物分子克隆的质粒表达载体。请列举这一质粒应具备哪些特性？并写出你在构建过程中的各个步骤。
2. 假设你在大肠杆菌中发现了一个强启动子的DNA序列，想利用它构建表达载体。请简述构建过程的各步骤。如何确保该启动子能够在新的载体中发挥预期的作用？
3. 你刚刚在小鼠体内发现了一种极其微量的蛋白质，该蛋白质能够有效治疗癌症。如何获得这种蛋白质产品？将在何种宿主中克隆该蛋白质的基因，为什么？将选择哪

类宿主来表达该蛋白质，为什么？

4. 基因治疗常常被用于遗传病患者。但被治愈的患者仍然会将遗传疾病传给他们的后代。请解释这一现象。说明为什么这一领域的研究并不像个体治疗研究那么吸引人？

（肖　亮　译，陈月华　校）

［Ｇｅｎｅｒａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ］
书名＝Ｂｒｏｃｋ微生物生物学 （原书第１１版） （下册）
页数＝１４６７
ＳＳ号＝１２１９２６４４